

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lucianna Costa de Almeida Barbosa

**Avaliação das atividades de migração celular e antimicrobiana de derivados
aminoguanidínicos**

Maceió
2019

Lucianna Costa de Almeida Barbosa

**Avaliação das atividades de migração celular e antimicrobiana de derivados
aminoguanidínicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo-Junior.

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a Regina Célia Sales Santos.

Maceió
2019

Catálogo na fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central

Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

B238a Barbosa, Lucianna Costa de Almeida.
Avaliação das atividades de migração celular e antimicrobiana de derivados aminoguanidínicos / Lucianna Costa de Almeida Barbosa. – 2019.
72 f. : il.

Orientador: João Xavier de Araújo Junior.
Coorientadora: Regina Célia Sales Santos.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 59-66.
Anexos: f. 67-68.

1. Aminoguanidinas. 2. Anti-infecciosos. 3. Citotoxinas. 4. Ensaios de migração celular. I. Título.

CDU: 615.28

FOLHA DE APROVAÇÃO

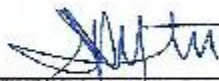
Lucianna Costa de Almeida Barbosa

Avaliação das atividades de migração celular e antimicrobiana de derivados
aminoguanidínicos / Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Alagoas

Dissertação submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Alagoas e aprovada em 07 de Outubro de 2019.



Prof. Dr. João Xavier de Araújo-Junior (Orientador) / UFAL



Prof. Dr. Regina Célia Sales Santos (Co-orientadora) / UFAL

Banca examinadora:



Prof. Dr. Thais Bernardo Honorio Lins Bernardo (Examinador Externo)



Prof. Dr. Magna Suzana Alexandre Moreira (Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda Sabedoria e Amor, por tornar essa jornada possível. Que todos os meus projetos sejam para melhor Servi-Lo e Sê-Lo.

Aos meus pais, Ana e Bento por todo o amor, apoio e suporte. Vocês são meu grande tesouro!

À Comunidade dos Viventes e a Gabriel Marquim, que me presentearam com o Sonho que dá sentido e cor aos meus dias.

A Glauton, por dividir comigo alegrias e tristezas; por ser colo e cuidado e por sempre me incentivar e acreditar em mim.

À Alice, Arthur, Audir, Beatriz, Caio, João, Luiza e Tainá por serem motivo de inspiração e orgulho. É bonito ver que continuamos crescendo juntos.

À Elisa e Laila, por permanecerem sempre comigo, compartilhando a vida. Que seja sempre assim!

A Wanderlei, que desde o primeiro momento me ajudou e acompanhou. Que bom que tivemos um ao outro nesse percurso, isso fez toda diferença! Obrigada por sua amizade e torcida.

À Regina Sales, que me acolheu na minha iniciação como pesquisadora, transmitindo os conhecimentos necessários que me possibilitaram chegar até aqui.

À toda turma do LQM, em especial ao professor João Xavier, pelas orientações. Também à Érica, que tanto me acolheu e se disponibilizou para tornar essa pesquisa possível.

À minha banca, Thais e Magna, pelas contribuições que enriqueceram esse trabalho.

À CAPES e à FAPEAL, pelo incentivo à pesquisa e ao conhecimento: elementos extremamente necessários para combater o obscurantismo desses tempos desafiadores de contingenciamentos na educação.

**“Pensa uma coisa: no final da tua vida,
quantas pessoas terão sido beneficiadas por ela?”**
@de.madrugada

RESUMO

As altas taxas de resistência antimicrobiana e a estagnação terapêutica fazem com que haja necessidade de produção de novos antibacterianos. Derivados aminoguanidínicos surgem como potenciais protótipos de fármacos promissores terapeuticamente, pois possuem diversas atividades relatadas, como antimicrobiana, antitumoral, antinociceptiva e antiglicante. Objetiva-se avaliar a atividade antimicrobiana e de migração celular para fibroblastos de derivados aminoguanidínicos. Os derivados aminoguanidínicos LQM 98, LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 foram provenientes do Laboratório de Química Medicinal (LQM/ICF/UFAL). A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo teste da microdiluição em caldo, com concentração estoque de 40 µg/ml e 400 µg/ml, para as cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella flexneri*. A viabilidade celular para fibroblastos, foi avaliada pelo teste colorimétrico do metiltetrazolium (MTT) e o potencial de migração celular para fibroblastos *in vitro*, pelo *scratch assay*. Os derivados LQM 98, LQM 99, LQM 100 e LQM 162 apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas testadas, porém as substâncias LQM 157, LQM 159 e LQM 161 não foram ativas. No teste da citotoxicidade para fibroblastos, apenas o derivado LQM 162 foi levemente citotóxico na concentração de 10 µM, sendo os demais derivados avaliados não citotóxicos; já na concentração de 100 µM, o LQM 99, LQM 100 e LQM 162 diminuíram consideravelmente a viabilidade celular e os derivados LQM 157, LQM 159 e LQM 161 não foram citotóxicos. Para o teste do *scratch assay in vitro*, na concentração de 10 µM, nenhum derivado promoveu a migração dos fibroblastos. Diante dos resultados encontrados, verifica-se a presença de atividade antimicrobiana para cepas Gram positivas e Gram negativas, a ausência da citotoxicidade ou citotoxicidade leve para fibroblastos na concentração de 10 µM e a ausência de potencial de migração de fibroblastos dos derivados aminoguanidínicos avaliados. Como perspectivas, novos derivados serão planejados com o intuito de obter uma classe de substâncias mais viável do ponto de vista antimicrobiano e para migração de fibroblastos.

Palavras-chave: Aminoguanidina. Agentes antimicrobianos. Agentes citotóxicos. Ensaios de migração celular.

ABSTRACT

The high rates of antimicrobial resistance and therapeutic stagnation make it necessary to produce new antibacterials. Aminoguanidine derivatives are therapeutically promising drugs, since they have several reported activities like antimicrobial, antitumor, antinociceptive and antiglycation properties. The following study aims to evaluate antimicrobial and migration activity of fibroblasts of aminoguanidine derivatives. The aminoguanidine derivatives LQM 98, LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 and LQM 162 were given by the Medicinal Chemistry Laboratory of Pharmacy and Nursing School (LQM/ICF/UFAL). The antibacterial activity was evaluated by broth microdilution method at stock concentrations of 40 µg / ml and 400 µg / ml for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella flexneri*; the cell viability was evaluated by the colorimetric method of methyltetrazolium (MTT) and the *in vitro* cell migration for fibroblasts by scratch assay. The aminoguanidine derivatives LQM 98, LQM 99, LQM 100 and LQM 162 showed inhibitory activity towards the tested bacteria, but the derivatives LQM 157, LQM 159 and LQM 161 did not show any antimicrobial activity. In relation to the cell viability assay, only the derivative LQM 162 was slightly cytotoxic at 10 µM, but the other derivatives were non-cytotoxic; the treatment at 100 µM with derivatives LQM 99, LQM 100 e LQM 162 induced a decrease in the percentage of viable cell, but the derivatives LQM 157, LQM 159 e LQM 161 were non-cytotoxic. In the *in vitro* scratch assay, none of aminoguanidine derivatives had significant effects on the cell migration of the fibroblasts. In view of the found results, the aminoguanidine derivatives showed antibacterial activity for Gram positive and Gram negative bacteria, no cytotoxic or slightly cytotoxic effects to fibroblast at 10 µM and lack of wound healing potencial. As perspective, new aminoguanidine derivatives will be planned, aiming to obtain a new class of substances more active for antimicrobial and cell migration purpose.

Wordkeys: Aminoguanidine. Antimicrobial agents. Cytotoxic agents. Cell migration assays.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Alvos bacterianos e exemplos de antibióticos.....	24
Quadro 2 - Classificação do percentual de viabilidade celular de acordo com a escala de citotoxicidade de Dahl; Frangou-Polyzois; Polyzois (2006).....	43
Quadro 3 - Concentrações dos derivados aminoguanidínicos para o teste antimicrobiano após conversão de unidades de microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) para micromolar (μM) considerando-se concentração estoque de $40 \mu\text{g/ml}$	72
Quadro 4 - Concentrações dos derivados aminoguanidínicos para o teste antimicrobiano após conversão de unidades de microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) para micromolar (μM) considerando-se concentração estoque de $400 \mu\text{g/ml}$	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	20
Figura 2 – Etapas da formação de biofilme.....	26
Figura 3 – Representação esquemática dos mecanismos de resistência bacteriana.....	27
Figura 4 – Estruturas químicas de guanidina, hidrazona e aminoguanidina hidrazona (AGH).....	29
Figura 5 – Estrutura química de aminoguanidina e do aminoácido arginina.....	29
Figura 6 – Protonação do cátion de nitrogênio imínico.....	30
Figura 7 – Estrutura química e peso molecular (g/mol) do LQM 17.....	37
Figura 8 – Modificações propostas para o LQM 17 para obtenção dos derivados aminoguanidínicos do presente estudo.....	38
Figura 9 – Resumo gráfico demonstrando a sequência do ensaio <i>in vitro</i> de migração celular.....	45
Figura 10 – Efeito dos derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 na viabilidade dos fibroblastos 3T3 nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M.....	50
Figura 11 - Efeito dos derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 na concentração de 10 μ M na migração dos fibroblastos 3T3.....	51
Figura 12 – Imagens do ensaio de migração dos fibroblastos em 0h e 24h para os LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 na concentração de 10 μ M.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura e concentração inibitória mínima de derivados aminoguanidínicos frente a diversas cepas bacterianas	32
Tabela 2 - Estrutura química e peso molecular dos derivados aminoguanidínicos.....	39
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição microbiana dos derivados aminoguanidínicos frente às bactérias Gram positivas em micromolar (μM) e [micrograma por mililitro ($\mu\text{g/ml}$)]	46
Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição microbiana dos derivados aminoguanidínicos frente às bactérias Gram negativas em micromolar (μM) e [micrograma por mililitro ($\mu\text{g/ml}$)]	48
Tabela 5 - Percentuais de viabilidade celular dos derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 para fibroblastos 3T3 nas concentrações de 10 μM e 100 μM	50
Tabela 6 - Percentuais de migração dos fibroblastos 3T3, na concentração de 10 μM , para as substâncias LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162.....	51
Tabela 7 - Comparação dos resultados obtidos para atividade antimicrobiana entre o LQM 17 e os derivados LQM 98, LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 frente às cepas <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> em micromolar (μM) e [micrograma por mililitro ($\mu\text{g/ml}$)]	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	Aminoguanidina
AGH	Aminoguanidina hidrazona
ATCC	American Type Cell Collection
CC	Controle de Crescimento
CE	Controle de Esterilidade
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Controle Negativo
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco Mem
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECM	Matriz extracelular
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
IL-1	Interleucina-1
IV	Infravermelho
LPS	Lipopolissacarídeo
LQM	Laboratório de Química Medicinal
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes a Meticilina
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NCCLS	Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards
OMP	Proteínas de Membrana Externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBP	Proteínas Ligadoras de Penicilina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDGF	Fator de Crescimento derivado de Plaquetas
pH	Potencial de Hidrogênio

PF	Ponto de Fusão
RNA	Ácido Ribonucleico
RMN	Ressonância Nuclear Magnética
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- α	Fator de Transformação do Crescimento Alfa
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TSST-1	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
TTC	Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistentes à Vancomicina
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Processo cicatricial de feridas.....	17
2.2. Bactérias: aspectos gerais	19
2.3. Principais bactérias que afetam leitos de feridas.....	21
2.4. Antibióticos e resistência bacteriana	23
2.5. Derivados aminoguanidínicos.....	29
2. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. Local do estudo	37
4.2. Obtenção dos derivados aminoguanidínicos	37
4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima por meio do método da microdiluição em caldo.....	40
4.4. Avaliação da citotoxicidade para fibroblastos pelo teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT).....	42
4.5. Avaliação da atividade migratória celular de fibroblastos <i>in vitro</i> por meio do teste do <i>scratch assay</i>	43
5. RESULTADOS.....	46
5.1. Teste da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima por meio do método da microdiluição em caldo	46
5.2. Teste da citotoxicidade para fibroblastos pelo teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)	49
5.3. Teste da atividade cicatrizante <i>in vitro</i> por meio do teste do <i>Scratch Assay</i>	50
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO A.....	72

1. INTRODUÇÃO

Feridas são danos nas estruturas que compõem os tecidos cutâneos (HUSSEIN et al., 2011). Visando reestabelecer a integridade tissular, ocorre a cicatrização, um processo de reparação interligado e sobreposto (GONZALEZ et al., 2016). Vários fatores podem interferir nesse processo e dentre os mais relevantes está a presença de infecção (GUO; DIPIETRO, 2010).

Sabe-se que os antibióticos ocasionaram uma grande revolução na área da saúde, no entanto, o seu uso desmedido proporcionou a seleção de cepas que possuem diversos mecanismos de resistência, acarretando num complexo problema, que tornou as possibilidades terapêuticas adotadas menos eficazes (GONZÁLES-BELLO, 2018).

Juntamente com a conjuntura da resistência bacteriana, houve uma estagnação na inovação farmacêutica para descoberta de novos antimicrobianos (RADLINSKI; CONLON, 2018). A grande maioria dos antibióticos que hoje estão no mercado foram desenvolvidos em meados do século XX, havendo, portanto, um grande vazio de novidades terapêuticas desde então (LEWIS, 2013).

Com isso, estudos para o desenvolvimento de novos fármacos e mecanismos frente à resistência antimicrobiana se fazem extremamente necessários. Nesse contexto, derivados aminoguanidínicos têm recebido considerável atenção por apresentarem variadas atividades farmacológicas descritas, como antibacteriana, antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória (WEI et al., 2016).

Dentre os grupos de pesquisa que estudam essas substâncias, está o Laboratório de Química Medicinal do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas (LQM/ICF/UFAL), o qual desenvolve trabalhos envolvendo síntese, caracterização e modificação estrutural de aminoguanidinas. A primeira investigação com esses produtos sintéticos foi realizada por Epifânio (2011), o qual sintetizou vinte aminoguanidinas que foram denominadas pelas siglas LQM 1 até LQM 20 e avaliou o potencial frente a células tumorais do cólon e do tipo melanoma, glioblastoma e de leucemia. Essas substâncias demonstraram capacidade antitumoral em concentrações abaixo de 4 µg/ml, sendo esses resultados considerados promissores.

Outras atividades foram averiguadas para as aminoguanidinas supracitadas. França (2014) avaliou a atividade *in vitro* para as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e os resultados obtidos para as substâncias LQM 8, LQM 10 e LQM 13 foram melhores que o do fármaco padrão adotado, a pentamidina. A atividade antidiabética e inibidora de produtos finais

da glicação avançada foi investigada em roedores e as aminoguanidinas LQM 3, LQM 13 e LQM 15 não expressaram toxicidade *in vivo*, além de conseguirem diminuir os valores da glicemia e demonstrar potencial antiglicante (SARMENTO, 2016).

Bernardo e colaboradores (2017) avaliaram o potencial antisséptico *in vivo* dessas substâncias. As aminoguanidinas LQM 3, LQM 10, LQM 15 e LQM 17 demonstraram baixa citotoxicidade e amplo espectro de ação antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Veríssimo (2017), demonstrou o potencial antimicrobiano *in vitro* e cicatrizante *in vivo* de aminoguanidinas hidrazonas. Nesse estudo, houve destaque para a aminoguanidina LQM 17, que apresentou resultados promissores, exibindo CIM de 1,42 μM para *S. aureus*, 13,68 μM para *S. epidermidis*, 58,16 μM para *E. coli* e 109,51 μM para *P. aeruginosa*, além de diminuir o tempo de cicatrização *in vivo* em dois dias para feridas em roedores infectadas por *S. aureus*.

Diante do exposto, fica evidente o potencial das aminoguanidinas LQM 1 ao LQM 20, as quais demonstraram atividades antitumoral, leishmanicida, antiglicante e hipoglicemiante, antisséptica, antibacteriana e cicatrizante de feridas. A partir delas, foram realizadas modificações estruturais visando a obtenção de novas moléculas derivadas dessas vinte primeiras.

A estrutura química da aminoguanidina LQM 17, a qual apresentou resultados expressivos no estudo de Veríssimo (2017), foi utilizada como ponto de partida para se realizar modificações estruturais para as substâncias obtidas na presente análise. Foram feitas alterações na posição do cloro e de rigidificação molecular, com a intenção de investigar quais repercussões a posição do substituinte halogenado ou a diminuição da liberdade conformacional da molécula têm nas atividades analisadas.

O interesse pelo estudo de Veríssimo (2017), se relaciona com a sua relevância na descoberta do potencial cicatrizante das aminoguanidinas, algo, até então, inovador, e que posteriormente culminou na geração de uma patente com essa classe de substâncias fazendo referência à essa atividade.

Dessa forma, a presente pesquisa visa avaliar novas substâncias derivadas das aminoguanidinas testadas por Veríssimo (2017), que foram modificadas por estratégias de química medicinal, com a finalidade de avaliar seu potencial antimicrobiano e de migração celular de fibroblastos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Processo cicatricial de feridas

A pele é um importante órgão que desempenha variadas funções como proteção, manutenção da homeostase do organismo, percepção sensorial, termorregulação e síntese de vitaminas, sendo dividida em três partes distintas. A epiderme é o revestimento mais superficial, possui células de pigmentação e receptores nervosos. A segunda camada é a derme, a qual é bem vascularizada e apresenta estruturas anexas, como glândulas e folículos pilosos. A hipoderme ou subcutâneo é a camada mais profunda, sendo formada por tecido adiposo, vasos e terminações nervosas (MURPHREE, 2017).

Estímulos químicos, físicos, térmicos ou elétricos podem resultar em uma lesão, ou seja, uma ruptura da continuidade tissular promovida pela danificação das células. Com o estabelecimento da ferida, o processo de cicatrização ocorre na tentativa de reparar os tecidos acometidos. A cicatrização é uma sequência de eventos interligados e sobrepostos, que acontece de maneira coordenada, visando reestabelecer a integridade tecidual (GONZALES et al., 2016).

O processo de cicatrização, quando transcorre sem interferências, sucede em quatro fases: hemostasia, a qual acontece nas primeiras horas depois do estabelecimento da ferida; fase inflamatória, que ocorre, em média, até o terceiro dia da lesão; fase proliferativa, que compreende o intervalo do quarto dia até três semanas e, por último, a fase de remodelamento, que abrange o período de vinte um dias até um ano após o estabelecimento da ferida (LANDÉN; LI; STAHL, 2016).

A hemostasia destina-se a evitar a perda sanguínea causada pela lesão por meio da diminuição do diâmetro dos vasos (vasoconstrição) e preenchimento da solução de continuidade com plasma e plaquetas. Esses componentes ativam a cascata de coagulação, culminando na formação de fibrina e na agregação plaquetária. Há ainda a liberação de citocinas, que são essenciais para as demais etapas desse processo (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

As citocinas liberadas pelas plaquetas apresentam funções diversas, pois agem em diferentes alvos celulares. Dentre elas, estão o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fatores de Transformação do Crescimento Alfa e Beta (TGF- α e TGF- β), Fator de Crescimento Entotelial Vascular (VEGF), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), tromboxano, leucotrienos, interleucina-1 (IL-1) e lipoxinas. Todas essas substâncias vão estimular a chegada de outras células no leito da ferida, a proliferação celular, vasoconstrição,

agregação plaquetária, aumento da permeabilidade vascular e auxiliar na transição celular entre as fases da cicatrização (QING, 2017).

Com o surgimento dos fagócitos na solução de continuidade, como os macrófagos e neutrófilos, se inicia a fase inflamatória, que tem como principal finalidade promover a limpeza da lesão, retirando patógenos e células inviáveis. Os neutrófilos são poderosas células fagocitárias, que promovem desbridamento da ferida, liberam substâncias com propriedades antimicrobianas e mediadores que provocam vasodilatação. Os macrófagos são reguladores da resposta inflamatória e preparam o ambiente para a fase subsequente, pois promovem, dentre outras coisas, a proliferação de fibroblastos (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

Outras células relevantes na fase inflamatória são os mastócitos. Eles liberam substâncias pró-inflamatórias, como histamina, que vão propiciar os sinais clássicos da inflamação, vasodilatação e consequente aumento da permeabilidade vascular, mas também têm um papel importante na regulação dessa etapa, produzindo substâncias anti-inflamatórias quando necessário (WULFF; WILGUS, 2013).

Passado o período inflamatório, inicia-se a fase proliferativa. Células endoteliais, estimuladas por VEGF promovem angiogênese, com a formação de diversos e frágeis capilares sanguíneos. Os fibroblastos secretam uma rica matriz extracelular (ECM), que juntamente com os novos vasos sanguíneos, formam o tecido de granulação. Ocorre ainda a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, os quais vão promover a contração da ferida. Por fim, as células epiteliais recobrem o leito da lesão, culminando em sua epitelização (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

Os fibroblastos merecem grande destaque na cicatrização, pois são um dos componentes mais fundamentais para o seu andamento, participando ativamente de praticamente todas as fases desse processo. Tanto a proliferação quanto a migração desse tipo celular são imprescindíveis para a reparação tecidual. Ainda no fim da fase inflamatória, eles chegam à ferida e promovem a degradação dos coágulos de fibrina e a produção de metaloproteinases, as quais regulam a ECM. Por meio da ação do TGF- β , essas células são diferenciadas em miofibroblastos, que promovem junção das bordas da lesão ao se ligarem às fibras de colágeno, causando compactação da matriz (BAINBRIDGE, 2013).

A última fase do processo de cicatrização, o remodelamento, tem como característica amadurecimento da lesão. Há mudança dos filamentos de colágeno do tipo III para o tipo I e organização da disposição dessas fibras. Esses processos resultam em alterações do aspecto da cicatriz. Desequilíbrios nessa etapa podem ocorrer, ocasionando cicatrizes anormais, como o quelóide ou a cicatriz hipertrófica (GANTWERCKER; HOM, 2011).

Essa substituição das fibras de colágeno é promovida pelos fibroblastos. Isso ocorre porque o colágeno III é mais rápido de ser produzido e atua como barreira aos patógenos e contra a perda de fluidos da lesão. No entanto, o colágeno I é muito mais resistente à tração, levando mais tempo para ser depositado. Quando a ECM apresenta uma força de tensão semelhante aos tecidos circunvizinhos, os fibroblastos sofrem apoptose e o processo de cicatrização termina (BAINBRIDGE, 2013).

Diversos elementos podem interferir no processo de cicatrização, levando ao seu retardamento ou a formação de uma ferida crônica. Os fatores sistêmicos acometem todo o organismo, e, portanto, também as lesões: idade, hormônios sexuais, estresse, isquemia, diabetes, obesidade, medicações, alcoolismo, tabagismo e nutrição. Já os fatores locais interferem diretamente na injúria, como oxigenação, insuficiência venosa, presença de corpos estranhos e infecção (GUO; DIPIETRO, 2010).

O início do processo infeccioso depende dos fatores de virulência apresentados pelas bactérias, como sua capacidade de formar biofilmes, e não apenas da quantidade de microrganismos presentes na lesão. O desenvolvimento de infecção manifesta sinais clássicos, como eritema, edema, calor, dor e produção de exsudado purulento (SALEH; SÖNNERGRÉN, 2016).

A presença de microrganismos no leito da lesão ativa o sistema imunológico, que envia células de defesa que secretam mediadores. Caso não seja possível cessar o processo infeccioso, as bactérias se multiplicam e promovem destruição do tecido de granulação, dos fatores de crescimento, colágeno, elastina e fibrina, comprometendo todo o processo cicatricial seriamente (SIMÕES et al., 2018).

Hoje, existem variadas coberturas utilizadas para o tratamento de feridas infectadas. Por exemplo, membranas, cremes e géis que apresentam antibióticos em sua estrutura, como β -lactâmicos, glicopeptídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina. Também são realizados curativos contendo produtos que carregam nanopartículas de prata, zinco, ferro e titânio, além do desenvolvimento de coberturas contendo produtos naturais como mel, óleos essenciais, quitosana, *Aloe vera*, entre outros. No entanto, mesmo encontrando diversas opções no mercado, ainda são necessárias melhorias e novas alternativas (SIMÕES et al., 2018).

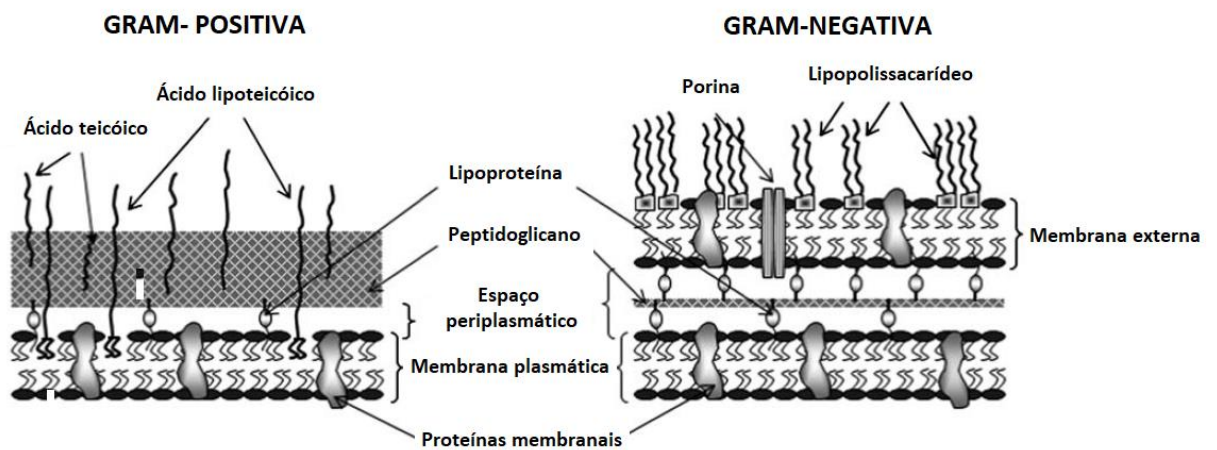
2.2. Bactérias: aspectos gerais

Bactérias são seres procariontes que apresentam em sua estrutura parede celular, membrana citoplasmática, ribossomos e ácido desoxirribonucleico (DNA). Podem exibir uma

ou mais moléculas de DNA adicional, denominadas plasmídeos, os quais atuam em funções adaptativas. Externamente à parede celular, elas podem ser encapsuladas por polissacarídeos e apresentar flagelos ou pili, os quais conferem mobilidade e adesão bacteriana às superfícies, respectivamente. Esses microrganismos desempenham fundamental influência no equilíbrio ambiental, no entanto, alguns deles podem provocar infecções (DORON; GORBACH, 2008).

Uma das classificações mais utilizadas na diferenciação dos tipos de bactérias é a coloração de Gram. Esse método categoriza os microrganismos de acordo com sua capacidade de fixar o complexo corante-iodo, definindo-os como Gram positivos ou Gram negativos. Essa rotulação se deve às diferenças encontradas na estrutura morfológica das bactérias (Figura 1) (SCHLEIFER; KANDLER, 1972).

Figura 1- Estrutura das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas



Fonte: VADILLO-RODRIGUEZ; DUTCHER, 2011.

A parede celular é a estrutura que faz relação da bactéria com o meio externo, portanto, diferenças nesse arcabouço provocam variadas modificações no comportamento bacteriano. Os microrganismos Gram positivos possuem um envelope mais simples, formado basicamente por uma espessa camada de peptidoglicano, sendo esse o constituinte mais abundante. Além disso, eles também apresentam ácidos teicóicos em sua estrutura e a membrana plasmática, de formação fosfolipídica clássica (FENG et al., 2015).

Já as bactérias Gram negativas possuem um envelope mais complexo, formando várias camadas, pois apresentam duas membranas lipídicas. A membrana externa é composta por lipopolissacarídeo (LPS), o qual é constituído por lipídeo A e antígeno O; já a interna é a membrana citoplasmática tradicional. A parede celular também é formada por peptidoglicano,

porém, em menor quantidade, sendo, portanto, menos espessa quando comparada com as das Gram positivas (KIMBRELL et al., 2008).

O peptidoglicano, nos organismos Gram negativos, se localiza numa estrutura compreendida entre a membrana externa e a interna, o periplasma. Esse espaço é um compartimento viscoso, que abriga diversas enzimas essenciais para manutenção da vida bacteriana e que desempenham funções como dobragem de proteínas, absorção e transporte de nutrientes e metabolismo de substâncias nocivas (GOEMANS; DENONCIN; COLLET, 2014).

A membrana externa das bactérias Gram negativas é uma bicamada assimétrica. Sua parte superficial é constituída por LPS e a parte interior, por fosfolipídeos, que juntos, atuam como uma barreira seletiva e dificultam a entrada de substâncias. Moléculas hidrofílicas de pequeno tamanho geralmente atravessam a parede desses microrganismos por meio de proteínas que formam canais na membrana, as chamadas proteínas de membrana externa (OMP) ou porinas (DELCOUR, 2009).

Uma característica importante sobre às diferenças na composição química das bactérias é que o LPS, nas bactérias Gram negativas, e o ácido teicóico, nas Gram positivas, que conferem uma carga negativa à superfície das células. No entanto, a carga negativa promovida pelo LPS é maior quando comparada à promovida pelo ácido teicóico (BRETADO-ARAGÓN et al., 2016).

2.3. Principais bactérias que afetam leitos de feridas

Bactérias encontram nas feridas um ambiente propício para sua multiplicação, seja essa microbiota residente, seja patogênica, pois é um local úmido, quente e rico em nutrientes. Dentre os microrganismos que mais comumente infectam feridas, estão *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (CEFALU; BARRIER; DAVIS, 2017). De forma menos frequente, mas não menos importante, também há relatos da presença de cepas de *Shigella flexneri* (GREGORY; STARR; OMDAL, 1974) e *Enterobacter cloacae* em lesões cutâneas (ANGEL et al., 2011).

Os estafilococos são um gênero de bactérias que se relacionam simbioticamente com seu hospedeiro. No entanto, quando ocorre o estabelecimento de soluções de continuidade, essas bactérias podem manifestar um caráter patogênico, provocando diversos tipos de infecção. As principais cepas desse grupo são *S. aureus* e *S. epidermidis* (GILL et al., 2005).

S. aureus é uma bactéria Gram positiva, de formato esférico e coloração dourada, que se apresenta constituindo aglomerados semelhantes a cachos de uvas e são produtores de coagulase. São comensais que colonizam de forma assintomática a narina, axilas e vagina, no entanto, quando encontram um ambiente favorável, podem provocar bacteremia, infecções de pele, endocardite, entre outros. Apresenta diversos fatores de virulência: proteínas de adesão a superfícies, as quais que limitam a resposta fagocítica do hospedeiro, como a proteína A e microcápsula de polissacarídeo; toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1); proteases, lipases, hialuronidase (LOWY, 1998).

S. epidermidis é comensal coagulase-negativo da pele humana e não apresenta tantos fatores de virulência, como as toxinas e enzimas encontradas em *S. aureus*. No entanto, possui grande capacidade de formar biofilmes, sendo muito associado à colonização de implantes, dispositivos intravasculares, *shunts* de líquido cefalorraquidiano, lentes intraoculares, articulações protéticas e nas substituições de válvulas cardíacas (KLEINSCHMIDT et al., 2015). Essa cepa tem adquirido grande importância epidemiológica nos últimos anos. Isso se deve à manifestação de resistência antimicrobiana, que ocorre provavelmente por causa da transferência de genes entre as espécies estafilocócicas (GILL et al., 2005).

Dentre as linhagens Gram negativas, está *E. coli*. É um membro da família Enterobacteriaceae, que é comensal do trato gastrointestinal. Existem diversas cepas de *E. coli* que foram adquirindo fatores de virulência e originando formas patogênicas, como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

E. coli é a bactéria que mais foi estudada e decifrada, tendo seu genoma completamente decodificado e publicado em 1997. Além disso, sua presença é empregada como um indicador de qualidade da água e alimentos, tendo, portanto, grande utilidade prática. Dentre os fatores de virulência conhecidos, estão fímbrias, pili, adesinas, capsulas de polissacarídeos, toxinas, como a verotoxina. Essas vantagens adaptativas são transmitidas horizontalmente entre as espécies via plasmídeos, bacteriófagos e transposons (ROBINS-BROWNE et al., 2016).

S. flexneri e *E. coli* são cepas que possuem parentesco genético, sendo difícil a diferenciação entre elas. Ambas pertencem à família Enterobacteriaceae, são Gram negativas e comumente associadas a infecções gastrointestinais. *S. flexneri* possui fatores de virulência codificados por plasmídeo (SCHROEDER; HILBI, 2008).

É também pertencente à família Enterobacteriaceae a cepa Gram negativa *E. cloacae*. Essa bactéria é ubiqüitária, ou seja, pode ser encontrada em diversos ambientes como água e

solo, mas tem adquirido importância epidemiológica por ser identificada principalmente em infecções nosocomiais. Dentre seus fatores de virulência estão a habilidade de formar biofilmes e secretar toxinas. Além disso, possui resistência intrínseca a alguns tipos de beta-lactâmicos (DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015).

P. aeruginosa é um bacilo Gram negativo oportunista, que pode ser encontrado em diversos ambientes, como água, solo e em animais. Provoca infecções urinárias, pulmonares, gastrointestinais, cutâneas e bacteremia. Possui quase todos os mecanismos de resistência conhecidos, sendo eles intrínsecos, como diminuição da permeabilidade membranar, bombas de efluxo e enzimas que inativam antibióticos (AZAM; KHAN, 2018).

Dentre as características marcantes de *P. aeruginosa*, destaca-se sua produção de pigmentos. É frequentemente encontrada na prática dermatológica, provocando infecções como ectima gangrenoso, foliculite, balanite, colonização de queimaduras e feridas. Possui diversos fatores de virulência, como flagelo, adesinas, formação de biofilmes, produção de toxinas, com destaque para toxina necrosante (MORAND; MORAND, 2017).

2.4. Antibióticos e resistência bacteriana

Antibióticos são definidos como substâncias que inibem a multiplicação bacteriana ou que promovem sua morte. Em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina, sendo esse momento considerado um grande marco para o controle das doenças infecciosas. Após isso, muitos fármacos naturais e sintéticos foram desenvolvidos e comercializados (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O mecanismo de ação do antibiótico é voltado para a interação entre um alvo específico na célula, impossibilitando a síntese de componentes indispensáveis à sua sobrevivência. As formas principais de atuação são por inibição da síntese de parede celular, inibição da síntese proteica, atingindo os processos de replicação do DNA, impedindo a síntese do ácido fólico ou afetando a estrutura da membrana citoplasmática (Quadro 1) (CHELLAT; RAGUZ; RIEDL, 2016).

Quadro 1 – Alvos bacterianos e exemplos de antibióticos

Alvo	Nome do antibiótico
Síntese de parede celular	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos, fosfomicina, oxamicina, glicopeptídeos
Síntese proteica	Aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos, clorafenicol, clindamicina
Síntese de ácidos nucleicos	Rifamicina, fluorquinolonas, aminocumarinas
Síntese de ácido fólico	Trimetoprim, sulfonamidas
Membrana citoplasmática	Lipopeptídeos, polimixinas

Fonte: GONZÁLES-BELLO, 2017

A conformação estrutural da parede celular de peptidoglicano é realizada pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBP). Antibióticos como β -lactâmicos e glicopeptídeos inibem as PBPs, culminando na inibição da síntese da parede celular. Já os antimicrobianos que impedem a síntese proteica funcionam se acoplando às subunidades 30S ou 50S ribossomais, causando erros na leitura dos ácidos nucleicos ou impedindo sua ligação à essa organela. Isso provoca a formação de proteínas defeituosas ou impossibilita totalmente a produção dessas macromoléculas (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Os antibióticos que interferem na síntese de material genético podem atuar em enzimas, como a helicase, a qual age desenrolando a molécula de DNA, ou nas topoisomerases, que afetam processos ligados ao ácido ribonucleico (RNA), influenciando, portanto, no andamento da replicação e/ou transcrição. Há ainda o mecanismo de ação que envolve o ácido fólico, o qual é sintetizado pelas bactérias, sendo fundamental para produção de seus ácidos nucleicos e proteínas. Os antimicrobianos que atuam inibindo a síntese do folato, agem como análogos dessa substância, atrapalhando o metabolismo bacteriano; já os que atuam na membrana plasmática operam desorganizando sua estrutura ou função (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016).

Há uma crença que os antibióticos podem curar qualquer doença, levando muitas vezes ao seu uso inapropriado. Outros fatores como escolhas de fármacos inadequados, doses insuficientes, não adesão ao tratamento, automedicação, venda de sem a exigência de prescrição, a utilização prolongada em hospitais e o perfil de alguns pacientes, como imunossuprimidos e idosos, contribuíram de forma determinante para a acelerar o processo de resistência bacteriana. Antibióticos eficientes são extremamente necessários para serviços hospitalares triviais, como transplantes, cirurgias, quimioterapia, assistência à recém-nascidos (PRESTINACI; PEZZOTI; PANTOSTI, 2015).

No entanto, muitos desses antibióticos não são mais efetivos como outrora frente aos microrganismos. A resistência bacteriana é um dos principais e mais complexos problemas de saúde pública atuais, sendo entendida como a diminuição ou ausência da ação dos fármacos antibióticos frente a esses microrganismos. Essa ineficiência tem repercussão direta no tratamento dos pacientes, tornando-os mais longos, mais custosos e interferindo nos casos de morbimortalidade (WHO, 2014).

Infecções nosocomiais são recorrentes em hospitais, principalmente nas unidades de terapia intensiva (UTI). Evidências mostram que no Brasil, sua taxa de prevalência chega a ser seis vezes maior que em outros lugares do mundo. Dentre os sistemas mais acometidos estão o trato respiratório, o trato urinário, infecções abdominais e da corrente sanguínea. Com relação aos custos por dia, eles dobram ou triplicam, a depender do local infectado, quando comparados com as despesas de pacientes que não apresentaram infecção (NANGINO et al., 2012).

Um estudo realizado com 426 culturas microbiológicas da UTI de um hospital brasileiro, entre 2005 e 2008, detectou que 61,7% das culturas eram colonizadas por bactérias resistentes, sendo as mais comuns *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina, seguidos de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (OLIVEIRA et al., 2017).

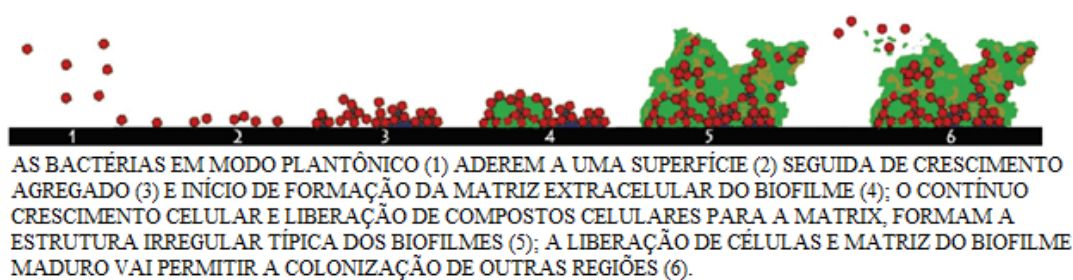
A resistência microbiana tornou-se um grande transtorno, principalmente porque seu progresso não foi acompanhado pela criação de novas alternativas de tratamento. Isso se deve a vários motivos, como o custo de produção dos antibióticos e o baixo retorno financeiro às companhias farmacêuticas. Também pode-se destacar que os métodos utilizados para elaboração de novos tratamentos não foram efetivos, resultando assim, nesse preocupante panorama mundial (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017).

A principal causa que leva ao aumento veloz da resistência pelos patógenos é uso demasiado e prescrição inadequada de antibióticos, inclusive na agricultura, que exercem pressão seletiva nos microrganismos. Além disso, podem ser elencados outros fatores, como a deficiência de abastecimento de água potável e a ausência da coleta de esgoto em algumas localidades, a globalização e o alto índice de densidade bacteriana hospitalar, os quais possibilitam e favorecem a transferência de material genético entre cepas (NIAID, 2014).

Um outro fator que contribui para a amplificação da resistência bacteriana são os biofilmes, os quais são definidos como uma organização aglomerada de microrganismos fenotipicamente diversos que estão imersos em matriz extracelular. Esta, confere uma barreira física de proteção aos patógenos, dificultando ainda mais a penetração e atuação dos antibióticos, tornando o tratamento mais custoso. O desenvolvimento de biofilmes se inicia pela

adesão a um substrato, colonização da superfície e descolamento das bactérias, as quais se disseminam para outras partes do organismo (Figura 2) (KUMAR et al., 2017).

Figura 2 - Etapas da formação de biofilme



Fonte: HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCAS, 2013.

De forma geral, os biofilmes são altamente resistentes à antibióticos, produtos desinfetantes e aos sistemas de defesa do organismo humano. Por causa disso, seu enfrentamento é muito complexo, pois o tratamento para esses casos é longo, necessitando de altas dosagens de antibióticos. Não dificilmente esse tipo de abordagem falha, apenas selecionando as bactérias mais fortes e aumentando ainda mais os casos de resistência bacteriana (FRIERI; KUMAR; BOURTIN, 2017).

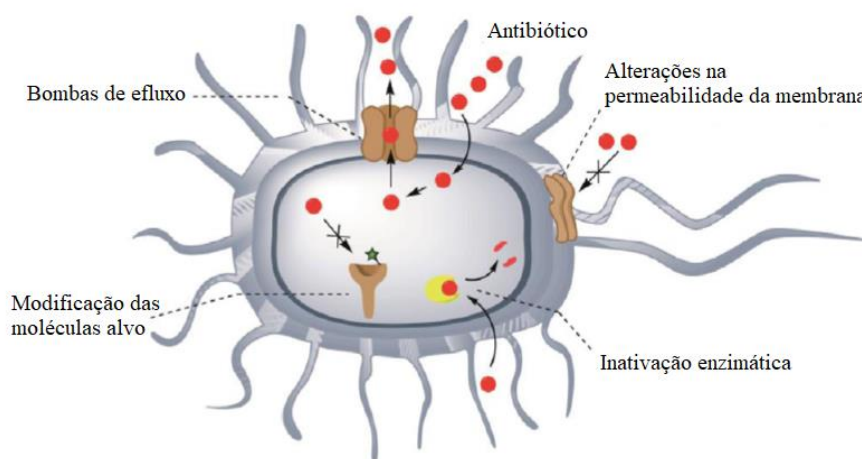
É importante destacar que o surgimento de bactérias resistentes é um processo que ocorre naturalmente, sempre que microrganismos são expostos à antimicrobianos. Isso porque os antibióticos exercem pressão seletiva, provocando a morte de bactérias mais suscetíveis. Os patógenos mais tolerantes à ação dos fármacos, têm maiores chances de permanecerem e se multiplicarem, originando linhagens de características semelhantes as suas (PRESTINACI; PEZZOTI; PANTOSTI, 2015).

A tolerância aos antibióticos pode ser inerente à bactéria, sendo uma característica própria da cepa, ou conquistada. Quando adquirida, pode estar relacionada à mutação cromossômica espontânea durante os processos de divisão celular, à transferência horizontal de material genético por plasmídeos, à absorção de DNA livre do meio ambiente ou através de um vírus, o qual transfere genes entre bactérias. Os processos que envolvem incorporação de material genético conferem maiores vantagens adaptativas aos patógenos do que os que envolvem apenas mutação (GIEDRAITIENĖ et al., 2011).

Os principais mecanismos de resistência são a fragmentação e consequente inativação das estruturas moleculares de antibióticos por enzimas; modificação dos sítios de ligação dos

antibióticos; bombas de efluxo e diminuição da permeabilidade das membranas, que dificulta a entrada do antibiótico no interior dos microrganismos (Figura 3) (LEWIS, 2013).

Figura 3 - Representação esquemática dos mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: GONZÁLEZ-BELLO, 2017.

A inativação enzimática dos antibióticos pode ocorrer por hidrólise, como é o caso das β -lactamases, as quais quebram o anel β -lactâmico cessando sua atividade antimicrobiana; ou por transferência de grupamentos químicos à molécula do antibiótico, impedindo que ele se ligue ao seu alvo. Podem também ocorrer modificações na estrutura do sítio de ação do antimicrobiano, o qual não consegue mais interagir de maneira eficiente com o alvo (BLAIR et al., 2015).

As bombas de efluxo são proteínas localizadas na estrutura da membrana, as quais expõem o antibiótico do meio intracelular para o meio extracelular, eliminando ou diminuindo drasticamente sua concentração a níveis não terapêuticos. Elas podem ser específicas para um tipo de substância ou carrear diferentes classes delas e em geral, é possível encontrá-las presentes em quase todos os tipos bacterianos (SUN; DENG; YAN, 2014).

As características físico-químicas e o tamanho dos antibióticos são condições determinantes para sua assimilação pela bactéria, a qual pode ocorrer por meio de difusão simples ou facilitada, sendo esse último tipo com auxílio das porinas. A quantidade de antibiótico que entra na célula se relaciona diretamente com a quantidade de porinas presentes na membrana. Um dos mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias é modificar a quantidade de porinas, diminuindo a permeabilidade membranar (COSTA; JUNIOR, 2017).

Bactérias comuns em infecções hospitalares já apresentam resistência à diversos antimicrobianos. Pensando nisso, a Organização Mundial de Saúde (OMS), divulgou em 2017 uma lista com espécies bacterianas de prioridade global para o desenvolvimento de antibióticos, baseada nas cepas que mais apresentam resistência e, portanto, provocam maiores transtornos e mortalidade.

Os microrganismos multirresistentes elencados em nível crítico para elaboração de antimicrobianos foram *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae* (como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter*); os de alta prioridade, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*; e os de média prioridade, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Shigella* spp. (WHO, 2017).

Diante disso, foi criada uma sigla para resumir as principais cepas multirresistentes causadoras de infecções nosocomiais pelo mundo, denominada ESKAPE. O acrônimo significa *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

Diversos antibióticos já têm sua eficiência extremamente reduzida frente à algumas cepas, como β -lactâmicos que são ineficazes para *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*; vancomicina, para *Enterococcus faecium* e *S. aureus*; fluorquinolonas para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., entre outros (WHO, 2017).

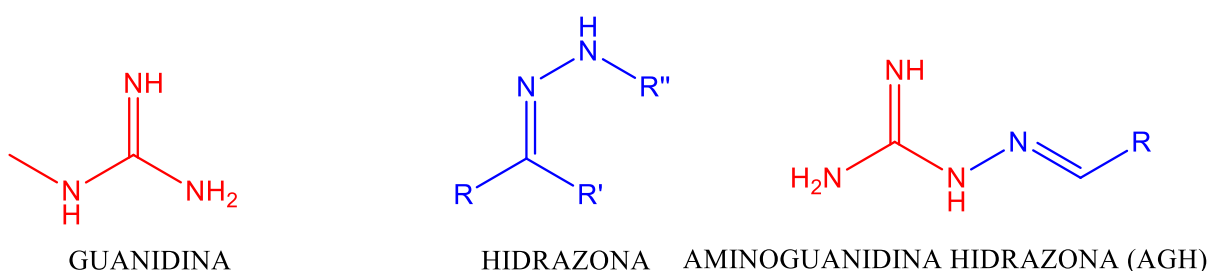
Uma estratégia adotada para contornar essa escassez por novas terapias foi a introdução de potencializadores de antibióticos, os chamados adjuvantes. Essas substâncias não apresentam atividade frente às bactérias, mas ajudam a driblar os mecanismos de resistência, aumentando a eficiência das drogas existentes. Entre os mais conhecidos estão o ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam, inibidores de bomba de efluxo e permeabilizadores de membrana externa (GONZÁLEZ-BELLO, 2017).

Elaborar um antibiótico é um grande desafio, porque são medicamentos caros de serem desenvolvidos. Pode-se dizer que precisam de altas dosagens para alcançar resultados, provocam toxicidade no organismo, não são medicamentos de uso crônico, propiciando, dessa forma, baixo retorno financeiro à indústria e apresentam um curto tempo de vida útil, já que os micróbios sempre desenvolvem mecanismos de resistência. Um antibiótico ideal deve ser eficaz no seu propósito, matando, inclusive, células resistentes e causando o mínimo de efeitos adversos possíveis. Ou seja, elementos complexos de serem conciliados (LEWIS, 2013).

2.5. Derivados aminoguanidínicos

As aminoguanidinas hidrazonas (AGH) ou guanilhidrazonas resultam de uma substância formada por meio da condensação da aminoguanidina a outra molécula, de modo que as duas fiquem unidas por meio de uma estrutura denominada hidrazona, que é um tipo de imina (Figura 4) (AQUINO, 2016).

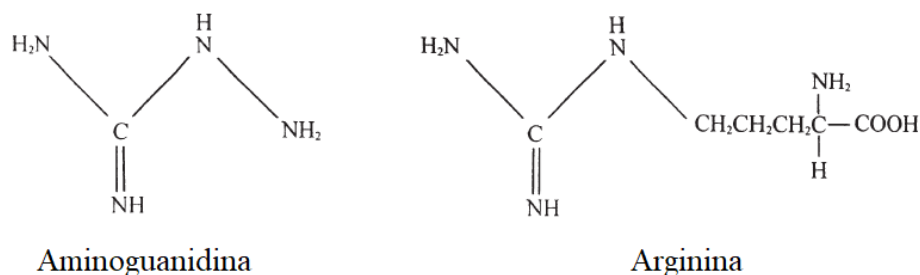
Figura 4 - Estruturas químicas de guanidina, hidrazona e aminoguanidina hidrazona (AGH)



Fonte: AQUINO, 2016.

As aminoguanidinas podem ser preparadas por reações de redução, hidratação ou hidrólise de compostos relacionados à guanidina e, por apresentarem diversas propriedades em comum com as hidrazinas, comumente são classificadas como um derivado seu. Thiele foi o primeiro a sintetizar essas substâncias, em 1892, por meio de uma reação de redução da nitroguanidina. De forma geral, pode-se dizer que a estrutura da aminoguanidina é semelhante à do aminoácido L-arginina (Figura 5), que faz parte da síntese de moléculas importantes, como o óxido nítrico (NILSON, 1999).

Figura 5 - Estrutura química de aminoguanidina e do aminoácido arginina

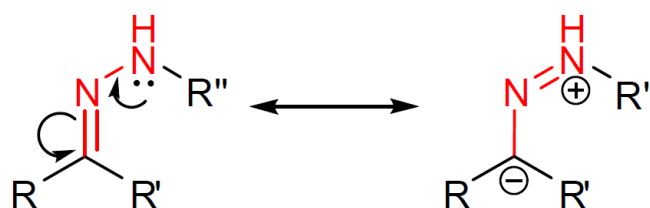


Fonte: Nilson, 1999.

Como hidrazina substituída, a aminoguanidina é capaz de se combinar com aldeídos e cetonas com a eliminação de água. A primeira AGH foi sintetizada pela reação de um sal de aminoguanidina com benzaldeído, numa solução concentrada de pH básico. Posteriormente, verificou-se que essa reação ocorreria de maneira muito mais eficiente em meio ácido (LIEBER; SMITH, 1938).

Dentre suas características físico-químicas, as guanidinas apresentam forte perfil alcalino, com basicidade comparada ao íon hidróxido. Esse atributo se deve a formação de cátion por protonação do átomo de nitrogênio imínico (Figura 6) (RACZYNSKA, et al., 1994). Os tipos de ligações intermoleculares mais realizada por guanidinas são as pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas com cargas negativas (FRANÇA, 2014).

Figura 6 - Protonação do cátion de nitrogênio imínico



Fonte: AQUINO, 2016.

As aminoguanidinas foram as primeiras substâncias a serem utilizadas como inibidores potentes dos produtos da glicação avançada (AGE), os quais promovem complicações vasculares na diabetes, como nefropatias. Um estudo realizado com a pimagedina, um cloridrato de aminoguanidina, verificou que a excreção de proteínas na urina e a progressão da retinopatia foram atenuadas com o uso dessa substância, demonstrando sua atividade antiglicante (FUKAMI; COOPER; FORBES, 2005).

Esse potencial antiglicante se relaciona, sobretudo, com a capacidade anti-radicalar das aminoguanidinas. Um estudo da atividade antioxidante realizado por Courderot-Masuyer e colaboradores (1999), demonstrou que essa classe de substâncias foi capaz de eliminar os radicais hidroxila e peroxila, ajudando a prevenir as disfunções vasculares provocadas pelo diabetes.

Ratos com diabetes induzida por aloxana foram tratados com aminoguanidinas hidrazonas. Foi observado que o protótipo testado se mostrou com um forte potencial para o tratamento dessa doença, pois promoveu um aumento da sensibilidade à ação da insulina (SARMENTO et al., 2014).

Em outro estudo, guanilhidrazonas derivadas da 2-piridina, 4-piridina e 4-quinolina carboxaldeídos apresentaram efeito anti-hipertensivo, promovendo um rápido decréscimo na pressão arterial média de ratos (FOYE et al., 1990). A atividade antinociceptiva de aminoguanidinas aril-hidrazonas foi testada em ratos com hiperalgesia induzida por fentanil. Observou-se que dois protótipos reduziram significativamente a dor através do bloqueio de receptores (HAMMOUD et al., 2018).

Várias pesquisas comprovam a capacidade antitumoral dessas substâncias. Andreani e colaboradores (2004), mostraram que as guanilhidrazonas derivadas de imadazo[2,1-*b*]tiazóis e de diimidazo[1,2-*a*:1,2-*c*]pirimidina foram testadas e apresentaram atividade *in vitro* frente à células cancerígenas de pulmão, mama e glioma. Em outra análise, AGHs derivadas de tetraidropirano tiveram uma potente atividade *in vitro* para células de leucemia mieloide crônica e aguda, além de adenocarcinoma mamário e de colón (SILVA et al., 2016).

França e colaboradores (2016) verificaram que AGH, principalmente as que apresentavam um maior caráter lipofílico, manifestaram boa atividade citotóxica frente às células cancerígenas de cólon, glioblastoma e melanoma, sendo um dos protótipos bastante seletivo para as linhagens tumorais e menos agressivo para macrófagos (FRANÇA et al., 2016).

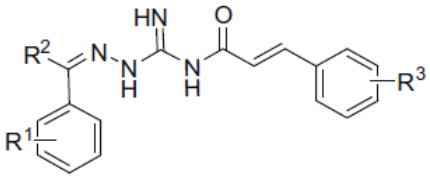
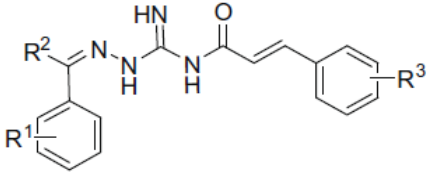
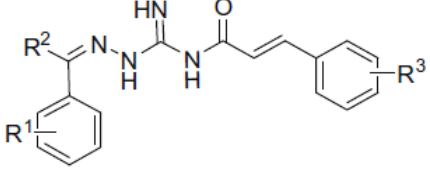
Há ainda outras atividades descritas na literatura com relação às aminoguanidinas hidrazonas, demonstrando seus variados potenciais farmacológicos. Um estudo realizado com guanilhidrazonas aromáticas avaliou seu comportamento frente às formas promastigotas de *Trypanosoma cruzi*, demonstrando que essas substâncias apresentaram uma relevante atividade anti-tripanosossomicida. Uma das AGH exibiu atividade vinte cinco vezes mais potente que o controle utilizado, o cristal violeta (MESSEDER; TINOCO; FIGUEROA-VILLAR, 1995).

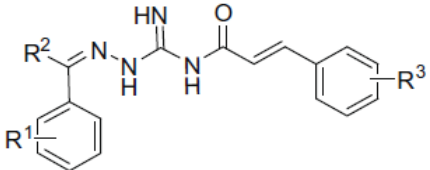
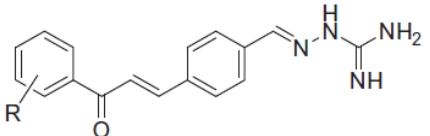
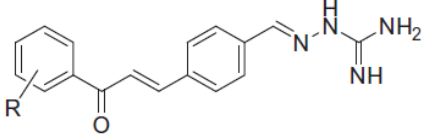
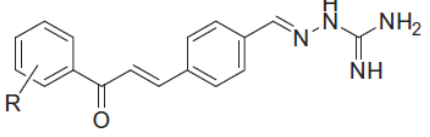
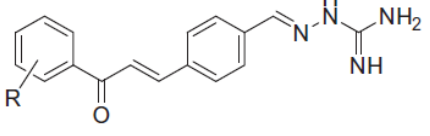
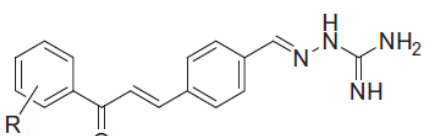
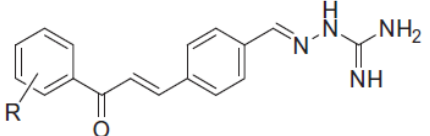
Com relação ao potencial antifúngico, bis(*N*-amidino)hidrazonas e *N*-(amidino)-*N'*-aril-bis-hidrazonas foram testadas frente a sete linhagens de *Candida albicans*, em concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 0,5 – 31,3 µM. Todos os protótipos apresentaram atividade antifúngica, sendo elas descritas como excelentes ou moderadas, e com resultados comparáveis ao do controle positivo anfotericina B (SHRESTHA et al., 2017).

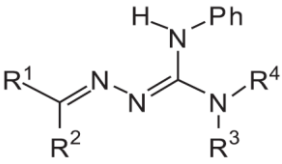
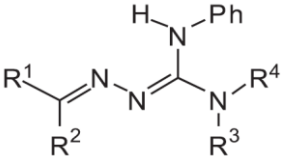
Aminoguanidinas associadas à chalconas também promoveram morte celular de *C. albicans*, sendo sua CIM igual ao do fluconazol (WEI et al., 2016). Estudos realizados com iminoguanidinas frente a isolados de *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporium canis* e *Trichophyton mentagrophytes* demonstraram uma potente atividade antifúngica (AJDACIC et al., 2016).

Diversas pesquisas relatam a capacidade antibacteriana das guanilhidrazonas frente a diferentes cepas bacterianas (Tabela 1). Um estudo realizado por Wei e colaboradores (2016) demonstrou que aminoguanidinas associadas à chalconas apresentaram excelente atividade antimicrobiana para as linhagens de *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, exibindo CIM com valores iguais ou menores que os controles adotados, gatifloxacina e moxifloxacina. Inclusive, a atividade para as bactérias Gram negativas foi melhor do que para as Gram positivas.

Tabela 1 - Estrutura e concentração inibitória mínima de derivados aminoguanidínicos frente a diversas cepas bacterianas

Substância	Cepa bacteriana	Concentração	Referência
$\text{HC}(\text{H}_2\text{C})_5\text{H}_3\text{C}=\text{N}-\text{NH}-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_3 \cdot \text{HNO}_3$ Heptanal guanyldrazone nitrate	<i>Staphylococcus aureus</i>	100 µg/ml	Carlson; Charlson; Watton, 1974.
 R1: 3,4,5-TriOCH₃ / R2:H / R3: OCH₃	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7,6 µM	Bairwa et al., 2010.
 R1: 3,4-DiOCH₃ / R2: H / R3: OCH₃ R1: 4-OH	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6,5 µM	Bairwa et al., 2010.
 R2: H / R3: OCH₃	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9,2 µM	Bairwa et al., 2010.

Substância	Cepa bacteriana	Concentração	Referência
 <p>R1: 3,4-DiOCH₃ / R2: H / R3: H</p>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8,9 μM	Bairwa et al., 2010.
 <p>R: 4-F</p>	<i>Escherichia coli</i>	8 μg/ml	Wei et al., 2016.
 <p>R: 3-Cl</p>	<i>Escherichia coli</i>	8 μg/ml	Wei et al., 2016.
 <p>R: 4-Cl</p>	<i>Escherichia coli</i>	8 μg/ml	Wei et al., 2016.
 <p>R: 2,4-Cl₂</p>	<i>Escherichia coli</i>	8 μg/ml	Wei et al., 2016.
 <p>R: 3-Br</p>	<i>Escherichia coli</i>	8 μg/ml	Wei et al., 2016.
 <p>R: 2,4-(CH₃)₂</p>	<i>Escherichia coli</i>	8 μg/ml	Wei et al., 2016.

Substância	Cepa bacteriana	Concentração	Referência
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,3 µg/ml	Cunha et al., 2009.
R1: Ph / R2: H / R3: c-C₆H₁₁/ R4: H			
	<i>Escherichia coli</i>	25 µg/ml	Cunha et al., 2009.
R1: Ph / R2: H/ R3: c-C₆H₁₁/ R4: H			

Fonte: autora da pesquisa, 2019.

Bis(*N*-amidinohidrazonas) e *N*-(amidino)-*N'*-aril-bis-hidrazonas mostraram ótima atividade antibacteriana para *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), *P. aeruginosa*, *Salmonella entérica* e *Mycobacterium smegmatis*, com CIMs variando entre 0,5 – 7,8 µM (SHRESTHA et al., 2017).

O potencial antibacteriano de algumas 5-guanilhidrazonas que apresentavam diferentes substituintes em sua estrutura foi investigado pelo teste de difusão em disco. A zona de inibição para *S. aureus* e *E. coli* foram equipotentes a sulfametoxazol, no entanto, não foram descritas atividade para *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *Pneumococci* (GADAD et al., 2000).

Também é descrita na literatura a capacidade das AGH de agirem não somente como substâncias antimicrobianas, mas como moduladores da ação antibiótica. Dantas e colaboradores (2018) demonstraram que as aminoguanidinas hidrazonas têm a habilidade de inibir a bomba de efluxo NorA em MRSA. Quando elas foram associadas à norfloxacina, reduziram em dezesseis vezes a quantidade de antibiótico capaz de provocar morte celular, reestabelecendo a sensibilidade de *S. aureus* a esse antimicrobiano.

Além de todos os potenciais destacados acima, é válido ressaltar a existência de diversas guanidinas e biguanidinas que já têm aplicação consagrada na terapêutica de doenças, como a sulfaguanidina, que apresenta propriedades antimicrobianas; a clonidina, com propriedades anti-hipertensivas; a metformina e fenformina, ambas com atributos antiglicemiantes (RACZYNSKA, et al., 1994).

Dessa forma, diante da conjuntura da resistência bacteriana e da estagnação na inovação terapêutica para descoberta de novos antimicrobianos, percebe-se a grande emergência por novos fármacos. Assim sendo, a presente pesquisa visa avaliar substâncias derivadas de uma das aminoguanidinas testadas por Veríssimo (2017), o LQM 17, que apresentou potenciais cicatrizante e antimicrobiano. Visando o melhoramento da potência e eficácia dessas atividades, foram realizadas modificações estruturais por estratégias de química medicinal para obtenção dos derivados aminoguanidínicos do presente estudo.

Tendo em vista o papel protagonista exercido pela migração dos fibroblastos para o leito de feridas e sua reparação e considerando-se também a interferência da presença de infecção no decurso do processo de cicatrização, o presente estudo tem a finalidade de avaliar o potencial antimicrobiano e de migração de fibroblastos *in vitro* de derivados aminoguanidínicos.

2. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as atividades antimicrobiana e de migração celular de derivados aminoguanidínicos.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a atividade antimicrobiana dos derivados aminoguanidínicos por meio da concentração inibitória mínima (CIM) para as linhagens *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella flexneri* pelo do teste de microdiluição em caldo.

Avaliar a citotoxicidade dos derivados aminoguanidínicos para fibroblastos pelo teste colorimétrico do metiltetrazolium (MTT).

Avaliar o potencial de migração celular para fibroblastos *in vitro* dos derivados aminoguanidínicos por meio do teste do *scratch assay*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

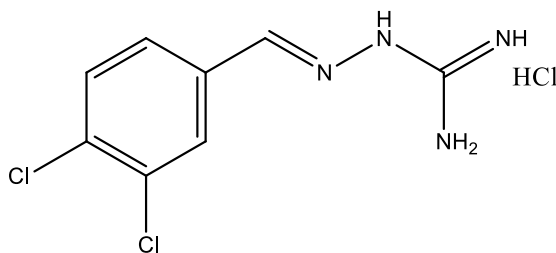
4.1. Local do estudo

A aquisição das substâncias sintéticas ocorreu por meio do Laboratório de Química Medicinal do Instituto de Ciências Farmacêuticas (LQM/ICF/UFAL). A avaliação antimicrobiana foi realizada no Laboratório para Tratamento de Feridas da Escola de Enfermagem (LpTF/EENF/UFAL) e os ensaios de citotoxicidade e do *scratch assay*, no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (LBC/ICBS/UFAL).

4.2. Obtenção dos derivados aminoguanidínicos

A síntese dos derivados aminoguanidínicos da presente análise foi baseada em modificações estruturais no LQM 17 (Figura 7), o qual foi utilizado por Veríssimo (2017). Essa substância apresentou resultados promissores, pois demonstrou CIM de 1,42 μM para *S. aureus*, 13,68 μM para *S. epidermidis*, 58,16 μM para *E. coli* e 109,51 μM para *P. aeruginosa*, além de diminuir o tempo de cicatrização *in vivo* em dois dias para feridas de ratos infectadas por *S. aureus*. A síntese do LQM 17 foi descrita por França e colaboradores (2016).

Figura 7 - Estrutura química e peso molecular (g/mol) do LQM 17

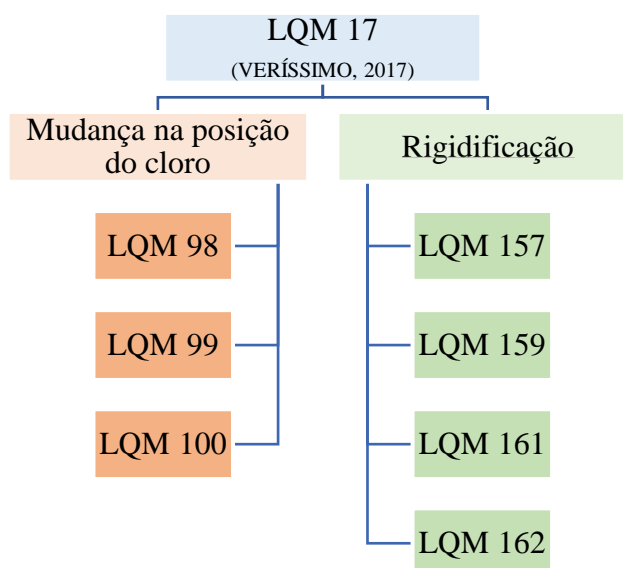


Peso Molecular: 267,54

Fonte: FRANÇA et al., 2016.

A partir disso, foram sugeridas alterações estruturais de mudanças na posição do átomo de cloro e rigidificação da molécula em anel de seis e anel de sete. Essas modificações foram escolhidas para avaliar se haveria alterações na atividade antibacteriana de acordo com a posição do átomo de cloro no anel aromático e se a restrição conformacional da molécula da aminoguanidina manteria sua atividade. Com isso, foram obtidos os derivados aminoguanidínicos LQM 98, LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 (Figura 8).

Figura 8 – Modificações propostas para o LQM 17 para obtenção dos derivados aminoguanidínicos do presente estudo



Fonte: autora da pesquisa, 2019.

A síntese das substâncias obtidas para o presente estudo ocorreu no Laboratório de Química Medicinal (LQM/ICF/UFAL). A síntese das substâncias LQM 98, LQM 99 e LQM 100 são descritas por Hammoud e colaboradores (2018) e envolvem a reação de aldeído comercialmente disponível com cloridrato de aminoguanidina por refluxo em etanol.

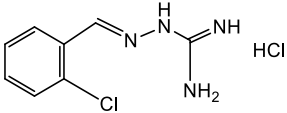
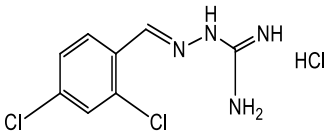
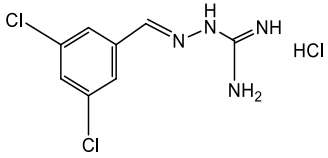
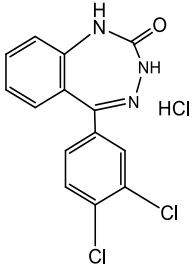
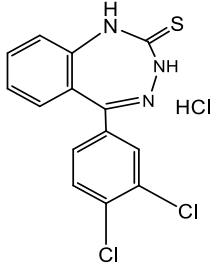
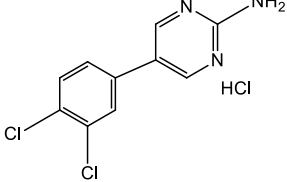
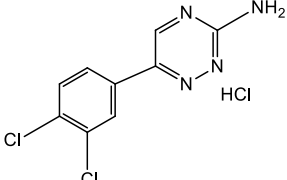
Os derivados LQM 157 e LQM 158 tem suas sínteses realizadas e descritas por Aquino (2016). A substância LQM 157 é uma benzotriazepin-2-ona, com metodologia dividida em três etapas. O derivado LQM 158 é uma benzotriazepin-2-tiona, obtida por meio da substituição do oxigênio das benzotriazepin-2-onas por enxofre por ação do reagente de Lawesson.

A substância LQM 161 é uma aminopirimidina, obtida segundo metodologia descrita por Itoh e Mase (2005). E o derivado LQM 162 é uma 4,5-diidroaminotriazinas obtida pela redução da ligação dupla da aminotriazina correspondente segundo metodologia descrita por Nguyen e colaboradores (2014).

A purificação dos derivados foi feita por cromatografia flash e o grau de pureza analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A caracterização dos produtos sintéticos foi feita por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono treze (^{13}C), infravermelho (IV) e ponto de fusão (PF) (FRANÇA et al., 2016).

A estrutura química e peso molecular dos derivados aminoguanidínicos obtidos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Estrutura química e peso molecular dos derivados aminoguanidínicos

Código	Peso molecular (g/mol)	Estrutura química
LQM 98	233,10	
LQM 99	267,54	
LQM 100	267,54	
LQM 157	342,61	
LQM 159	358,67	
LQM 161	276,55	
LQM 162	279,55	

Fonte: autora da pesquisa, 2019.

4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima por meio do método da microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo teve seu protocolo baseado no *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003) e foi utilizado para avaliar a atividade antibacteriana dos produtos sintéticos frente às bactérias padronizadas pela American Type Cell Collection – ATCC/Manassas - VA/USA, sendo as cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 e as cepas Gram negativas, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 e *Shigella flexneri* ATCC 12022.

A avaliação foi feita utilizando-se duas concentrações na primeira linha da placa de 96 poços: 20 µg/mL e 200 µg/mL. Para isso, os produtos sintéticos foram solubilizados em solução de dimetil-sulfóxido (DMSO) a 2%. Foi utilizado 2 mg do derivado aminoguanidínico, 100 µL de DMSO e 4,9 ml de soro fisiológico, formando a solução de concentração 400 µg/mL. Posteriormente, 100 µL dessa solução de 400 µg/mL foi rediluída em 1 ml de soro fisiológico, obtendo-se assim, a concentração estoque de 40 µg/mL. As cepas que não apresentaram nenhum resultado com a concentração estoque de 40 µg/mL foram novamente reavaliadas na concentração estoque de 400 µg/mL.

As 12 colunas (1 - 12) e 8 linhas (A - H) da placa de microdiluição de 96 poços foram preenchidas por 100 µL caldo Mueller-Hinton. Posteriormente, 100 µL das soluções estoque das substâncias sintéticas foram inoculadas em triplicata, nas colunas de 1 a 9 da linha A. Transferiu-se 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A para os orifícios da linha B e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H. Assim, se obtiveram as concentrações decrescentes em µg/mL.

A coluna 10 refere-se ao controle negativo (CN) que foi formado por solução de DMSO a 2% diluída em soro fisiológico. A coluna 11 foi o controle de crescimento (CC), composto por caldo Mueller-Hinton e o inóculo bacteriano e a coluna 12 se destinou ao controle de esterilidade (CE), no qual foi utilizado apenas o caldo Mueller-Hinton. Para o controle positivo da atividade antibacteriana foi utilizado ciprofloxacino, por ser considerado um antibiótico de amplo espectro e sua concentração estoque foi de 40 µg/ml.

A solubilização de bactérias foi feita de acordo com o padrão de 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a uma solução de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Essa solução foi rediluída numa proporção de 1:10 (v/v), obtendo-se a concentração padrão de 10^7 UFC/mL. Os poços receberam 5 µL de inóculo bacteriano, finalizando uma concentração de 5×10^5 UFC/mL ou 5×10^4 UFC/poço.

A concentração final de bactérias de 5×10^5 UFC/mL ou 5×10^4 UFC/poço está de acordo com o preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Após isso, as placas foram armazenadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 18 horas. Passado esse período, foi adicionado 20 µL de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazolium (TTC) a 5% em cada poço e as placas retornaram à estufa por mais 3 horas. A interpretação do teste foi feita da seguinte forma: os poços que demonstraram coloração avermelhada, indicaram que houve crescimento bacteriano; os que mantiveram a coloração original, atestaram inibição do crescimento de bactérias.

A comprovação quantitativa do teste da microdiluição em caldo foi realizada por leitura em espectrofotômetro, com densidade óptica de 492 nm, determinando assim, a absorbância de cada poço antes e depois do acréscimo do inóculo. A equação utilizada foi (GUDIÑA et al., 2010):

$$\% \text{ de inibição do crescimento microbiano} = \left[1 - \left(\frac{Ac}{A0} \right) \right] \times 100$$

Onde:

Ac representa a diferença entre as médias da absorbância dos poços com inóculo, das médias da absorbância dos poços sem inóculo.

A0 representa a absorbância do controle de crescimento microbiano.

As substâncias que, quando comparadas com o controle de crescimento, apresentaram o percentual de inibição do crescimento microbiano maior que 80%, foram consideradas possuidoras de propriedades antimicrobianas (HOLETZ et al., 2002).

Por questões de comparação dos resultados entre os três testes realizados, os valores das CIM foram convertidos de microgramas por mililitro (µg/mL) para micromolar (µM), com o auxílio da fórmula:

$$\text{Concentração molar} = \frac{m}{MM \times v}$$

Onde:

m representa a Massa utilizada da substância, em gramas (g).

MM representa a Massa Molar da substância, em gramas por mol (g/mol).

v representa o volume da solução, em litros (L).

Como a concentração molar considera a massa molar de cada substância, os resultados de concentração inibitória mínima para cada derivado aminoguanidínico testado tiveram

valores diferentes. Para facilitar a visualização das concentrações obtidas em cada linha da placa de 96 poços após a conversão de microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) para micromolar (μM), foram confeccionados dois quadros que estão inseridos na seção de Anexo A.

4.4. Avaliação da citotoxicidade para fibroblastos pelo teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)

A citotoxicidade foi analisada por meio do método colorimétrico do metiltetrazolium (MTT). Esse teste avalia a viabilidade da célula a partir da redução do sal tetrazólio (coloração amarela) para formazan (coloração azul escuro), baseando-se na atividade da enzima succinato desidrogenase, atuante apenas em organismos viáveis as quais possuem mitocôndrias vivas (MOSMANN, 1983).

Fibroblastos 3T3 foram cultivados em meio de eagle modificado por dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2 mM) e gentamicina (40 $\mu\text{g/mL}$) em incubadora umidificada em atmosfera com 5% de CO_2 a 37 °C.

As células foram semeadas em uma placa de 96 poços (7 x 10³ células/poço) durante a noite e tratadas com os produtos sintéticos nas concentrações de 10 e 100 μM , por 24 horas. Após a incubação com o tratamento, 22,5 μL de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich - EUA) (5 mg/mL em tampão fosfato salino - PBS) foi adicionado a cada poço durante 4 horas.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 150 μL de DMSO foi adicionado em cada poço, para solubilizar os cristais de formazan formados. As absorbâncias dos poços foram registradas usando espectrofotômetro e a densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm. A percentagem de células de viabilidade foi calculada através desta fórmula:

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

A classificação do percentual de viabilidade celular foi realizada de acordo com a escala de citotoxicidade de Dahl; Frangou-Polyzois; Polyzois (2006), a qual refere os seguintes resultados (Quadro 2).

Quadro 2 - Classificação do percentual de viabilidade celular de acordo com a escala de citotoxicidade de Dahl, Frangou-Polyzois & Polyzois, 2006

Percentuais de viabilidade celular	Classificação
Maiores que 90%	Não citotóxica
60% - 90%	Levemente citotóxicos
30% - 59%	Moderadamente citotóxicos
Abaixo de 30%	Severamente citotóxicos

Fonte: Dahl, Frangou-Polyzois & Polyzois, 2006.

Na avaliação de citotoxicidade para fibroblastos e teste do *scratch assay* foi utilizado um critério, objetivando selecionar as substâncias que seriam encaminhadas. Isso porque para realização dos testes com os fibroblastos, era preciso que as células estivessem viáveis e substâncias muito citotóxicas promoveriam morte celular intensa, prejudicando os resultados desses experimentos. Como parâmetro, foram usados dados internos do Laboratório de Química Medicinal com relação ao ensaio citotóxico para macrófagos J774, que foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Imunidade do Instituto de Ciências Biológicas de da Saúde (LaFI/ICBS/UFAL) (dados não publicados). A citotoxicidade do LQM 98 para macrófagos a 10 μ M foi acentuada, sendo ele excluído do seguimento da análise. Os derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 não foram citotóxicos ou foram apenas levemente tóxicos e, portanto, foram encaminhados para os ensaios com fibroblastos.

4.5. Avaliação da atividade migratória celular de fibroblastos *in vitro* por meio do teste do *scratch assay*

O ensaio do *scratch assay* é um dos métodos mais populares para se observar migração celular, processo que ocorre no desenvolvimento embrionário, resposta imunológica, na fisiopatologia do câncer e na cicatrização. Ele apresenta diversas vantagens, como a observação do movimento e da morfologia celular em tempo real, a medição da velocidade de migração, além de ser um teste simples, de rápida configuração, fácil análise e baixo custo (GOTSULYAK et al., 2014).

A migração celular é um evento importante, que . Estudar os fatores que podem afetar esse processo, ajuda a direcionar as terapias para favorecer seu andamento. Sua avaliação *in vitro* se baseia na criação de uma lacuna em uma monocamada de células confluentes, com o intuito de observar se as bordas do campo artificial criado vão formar novos contatos célula-célula, no sentido de seu fechamento (CAPPIELLO; CASCIARO; MANGONI, 2018).

Para análise do efeito dos derivados aminoguanidínicos sobre a migração de fibroblastos 3T3, foi utilizado o ensaio do *scratch assay*, de acordo com a metodologia descrita por Liang,

Park & Guan (2007). As células foram cultivadas em garrafas estéreis de poliestireno, com meio de cultura DMEM, contendo 10% de SFB. Posteriormente, foram colocadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 24 horas, para alcançarem alta confluência.

Após isso, foram realizadas as subculturas utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as células aderidas. Elas foram transferidas para uma placa de múltiplos poços e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C, até se encontrarem completamente aglutinadas umas nas outras e espalhadas no substrato, com densidade de 7 x 10⁴ células por poço.

Então, o sobrenadante do meio de cultura foi desprezado e se realizou um risco em linha reta na região mediana da placa, com a ponta da pipeta de 200µL, promovendo a formação de uma “ferida”. Os debris foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Então, os fibroblastos foram tratados com as substâncias LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161, LQM 162 na concentração de 10 µM. Essa concentração foi escolhida pois foi a que os fibroblastos apresentaram maior viabilidade celular no teste do MTT. Como controle do tratamento, foram utilizadas as células cultivadas em DMEM, com SFB a 2%.

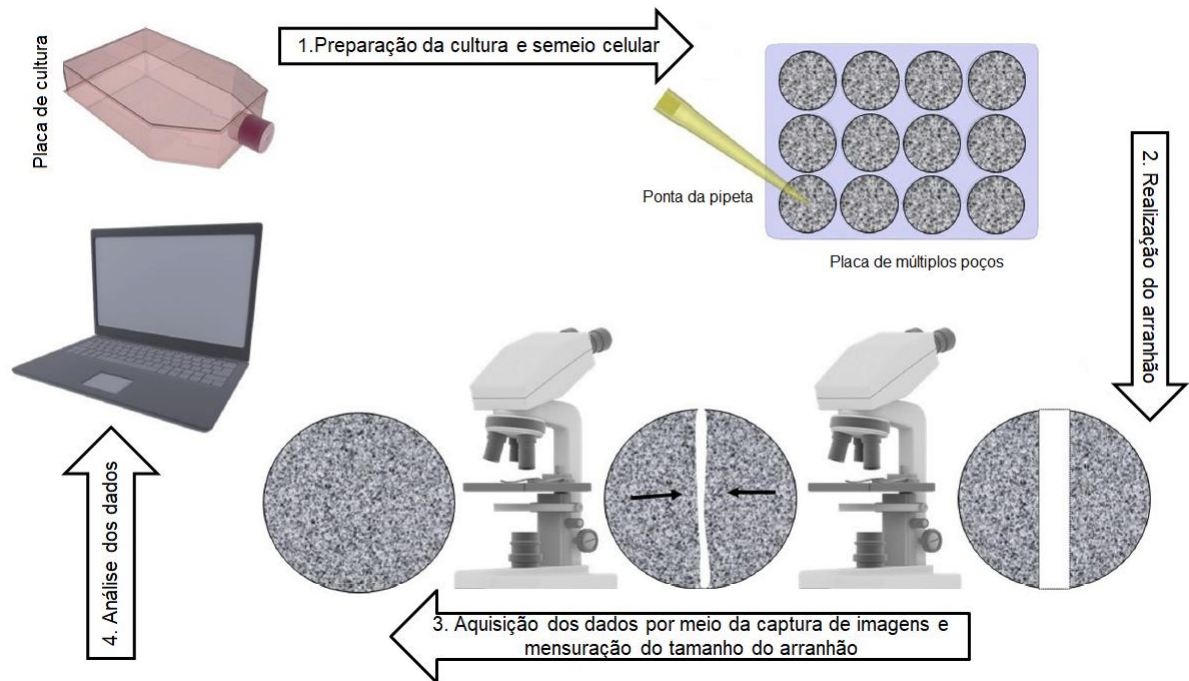
Para observação dos resultados, são feitas imagens com o auxílio de câmera digital acoplada ao microscópio invertido de fase (Olympus IX70), utilizando *software* NIS Elements F3.2. Essas fotos foram feitas nos tempos de 0 e 24 horas após a inclusão das substâncias e visam comparar a diferença da distância entre as bordas nos intervalos determinados.

A migração celular é medida com o *software* ImageJ. O percentual de migração de feridas foi calculado com base na redução da área do risco e os dados são expressos com as média ± SEM. A fórmula utilizada pelo *software* é descrita abaixo (HADDADI; TAMRI; JOONI, 2019):

$$\% = \frac{(\text{área do arranhão } 0 \text{ h} - \text{área do arranhão } 24 \text{ h}) \times 100}{\text{área do arranhão } 0 \text{ h}}$$

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 (Figura 9).

Figura 9 - Resumo gráfico demonstrando a sequência do ensaio *in vitro* de migração celular



Fonte: GRADA et al., 2016.

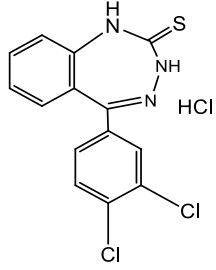
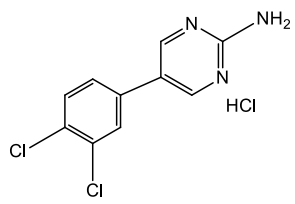
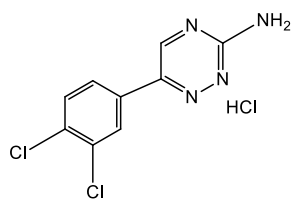
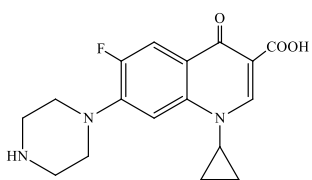
5. RESULTADOS

5.1. Teste da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima por meio do método da microdiluição em caldo

No teste da microdiluição em caldo foram utilizados os microrganismos Gram positivos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Tabela 3) e os Gram negativos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella flexneri* (Tabela 4).

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição microbiana dos derivados aminoguanidínicos frente às bactérias Gram positivas em micromolar (μM) e [micrograma por mililitro ($\mu\text{g/ml}$)]

Código	Estrutura química	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição (%)			
		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
		μM [$\mu\text{g/ml}$]	%	μM [$\mu\text{g/ml}$]	%
LQM 98		429,0 [100]	99,3	429,0 [100]	99,2
LQM 99		74,75 [20]	99,9	74,75 [20]	97,8
LQM 100		46,7 [12,5]	97,3	74,75 [20]	91,1
LQM 157		SA	SA	SA	SA

Código	Estrutura química	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição (%)			
		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
		μM [$\mu\text{g/ml}$]	%	μM [$\mu\text{g/ml}$]	%
LQM 159		SA	SA	SA	SA
LQM 161		SA	SA	SA	SA
LQM 162		71,54 [20]	99,8	71,54 [20]	99,2
Ciprofloxacino		0,47 [0,16]	99,8	0,94 [0,31]	98,4

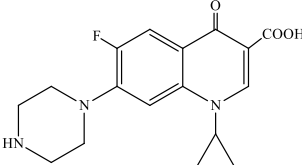
Nota: SA – Sem atividade. Concentrações expressas em μM e [$\mu\text{g/ml}$]. Fonte: autora da pesquisa, 2019.

Foi observado que os derivados LQM 98, LQM 99, LQM 100 e LQM 162 apresentaram atividade antimicrobiana para as cepas Gram positivas. O LQM 98, LQM 99 e LQM 162 exibiram a mesma concentração inibitória mínima para *S. aureus* e *S. epidermidis*. A menor CIM foi do LQM 100 para *S. aureus*, de valor 46,72 μM .

As substâncias LQM 157, LQM 159 e LQM 161 não mostraram atividade para essas cepas.

Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição microbiana dos derivados aminoguanidínicos frente às bactérias Gram negativas em micromolar (μM) e [micrograma por mililitro ($\mu\text{g/ml}$)]

Código	Estrutura química	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição (%)							
		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>S. flexneri</i>	
		μM [$\mu\text{g/ml}$]	%	μM [$\mu\text{g/ml}$]	%	μM [$\mu\text{g/ml}$]	%	μM [$\mu\text{g/ml}$]	%
LQM 98		85,8 [20]	99,7	858,0 [200]	99,8	-	-	858,0 [200]	99,8
LQM 99		74,75 [20]	99,8	214,5 [50]	99,6	214,5 [50]	99,7	107,2 [25]	99,1
LQM 100		74,75 [20]	99,5	214,5 [50]	99,7	429,0 [100]	99,8	214,5 [50]	99,7
LQM 157		SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
LQM 159		SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
LQM 161		SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
LQM 162		71,54 [20]	99,8	71,54 [20]	99,2	358,7 [100]	99,7	44,7 [12,5]	99,9

Código	Estrutura química	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição (%)							
		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>S. flexneri</i>	
		μM [$\mu\text{g/ml}$]	%	μM [$\mu\text{g/ml}$]	%	μM [$\mu\text{g/ml}$]	%	μM [$\mu\text{g/ml}$]	%
Ciprofloxacino		0,01 [0,0097]	100	0,47 [0,16]	99,6	0,12 [0,04]	99,5	0,9 [0,3]	99,6

Nota: SA – Sem atividade. Concentrações expressas em μM e [$\mu\text{g/ml}$]. Fonte: autora da pesquisa, 2019.

Os derivados LQM 99, LQM 100 e LQM 162 demonstraram potencial antimicrobiano para as cepas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* e *S. flexneri*. O LQM 98 apresentou atividade para todas as espécies bacterianas testadas, exceto para *E. cloacae*. O LQM 157, LQM 159 e LQM 161 não tiveram atividade para nenhuma cepa. O valor mais baixo da CIM para as Gram negativas é observado para o LQM 162 e *S. flexneri*, com 44,7 μM .

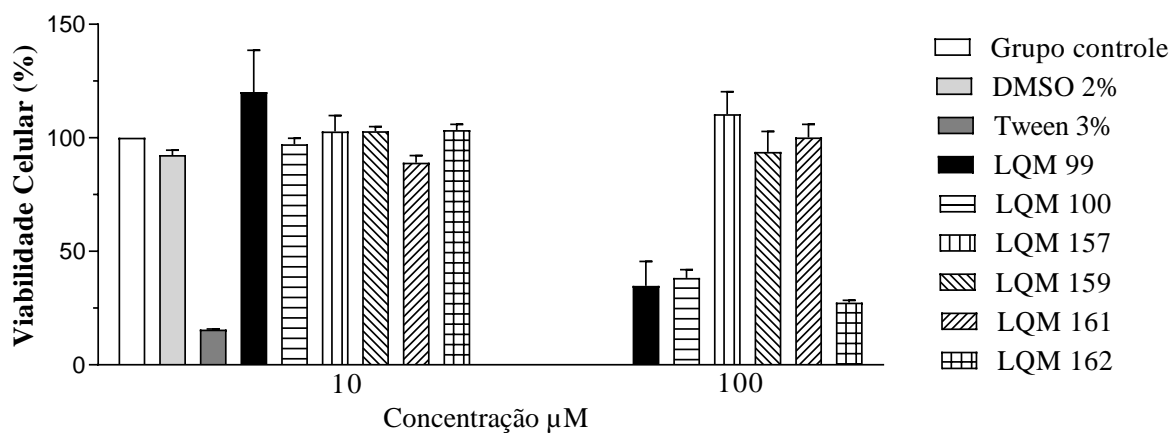
5.2. Teste da citotoxicidade para fibroblastos pelo teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)

O estudo da atividade citotóxica dos produtos sintéticos ocorreu através do método colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT). Os derivados LQM em questão foram avaliados frente a linhagens de fibroblastos 3T3 nas concentrações de 10 μM e 100 μM .

O DMSO a 2% foi utilizado como solvente das amostras, apresentando valor de viabilidade celular de 92,4%, não demonstrando, citotoxicidade. O tween a 3% foi utilizado como controle de morte celular, apresentado viabilidade de 15,5%.

O tratamento com as substâncias a 10 μM não apresentou efeitos citotóxicos na viabilidade celular dos fibroblastos para as aminoguanidinas LQM 99, LQM100, LQM 157, LQM 159 e LQM 162, no entanto, o LQM 161 demonstrou leve citotóxicidade. Na concentração de 100 μM os derivados LQM 157, LQM 159 e LQM 161 foram não citotóxicos, os derivados LQM 99 e LQM 100 foram moderadamente citotóxicos e o LQM 162 foi severamente citotóxico (Figura 10). Destaca-se aqui o comportamento do derivado aminoguanidínico LQM 161, que na concentração de 10 μM apresentou-se levemente citotóxico, mas na concentração de 100 μM foi não citotóxico para as células.

Figura 10 - Efeito dos derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 na viabilidade dos fibroblastos 3T3 nas concentrações 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).

Fonte: autora da pesquisa, 2019.

Os valores percentuais obtidos com relação às células viáveis, para as concentrações de 10 μ M e 100 μ M, estão descritos na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 - Percentuais de viabilidade celular dos derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 para fibroblastos 3T3 nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M

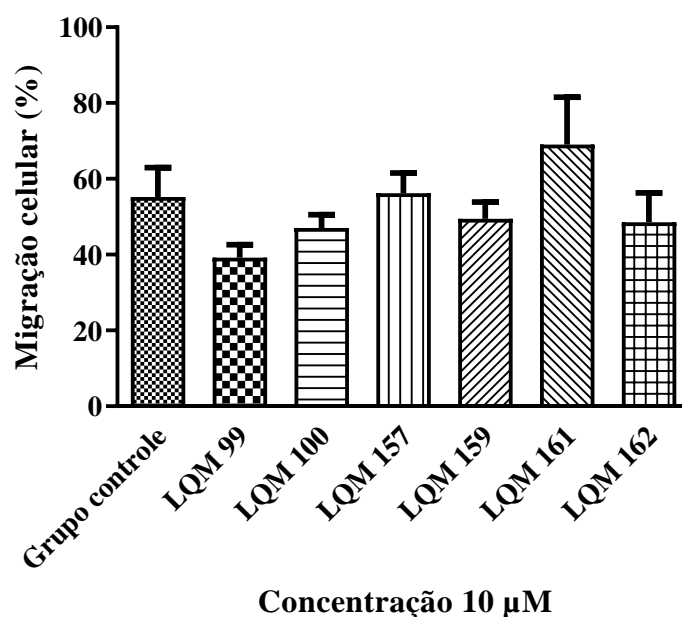
Código	Percentual de células viáveis (%)	
	10 μ M	100 μ M
LQM 99	120.14 \pm 18.40	34.75 \pm 10.87
LQM 100	97.20 \pm 2.63	38.31 \pm 3.61
LQM 157	102.82 \pm 7.04	110.49 \pm 9.84
LQM 159	102.89 \pm 2.00	93.81 \pm 9.05
LQM 161	89.05 \pm 3.08	100.21 \pm 5.68
LQM 162	103.44 \pm 2.53	27.41 \pm 1.01

Fonte: autora da pesquisa, 2019. O percentual de viabilidade do solvente dos derivados aminoguanidínicos (DMSO 2%) foi de 92,4%. O controle de morte celular (tween 3%) teve percentual de viabilidade de 15,5%.

5.3. Teste da atividade de migração celular *in vitro* por meio do teste do *Scratch Assay*

Os derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 foram avaliados na concentração de 10 μ M e os resultados demonstraram que não houve efeitos significativos na migração dos fibroblastos quando comparados ao grupo controle (Figura 11).

Figura 11 - Efeito dos derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162, na concentração de 10 μ M, na migração dos fibroblastos 3T3



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).

Fonte: autora da pesquisa, 2019.

Os valores percentuais obtidos com relação à migração dos fibroblastos para a concentração de 10 μ M estão descritos na tabela abaixo (Tabela 6).

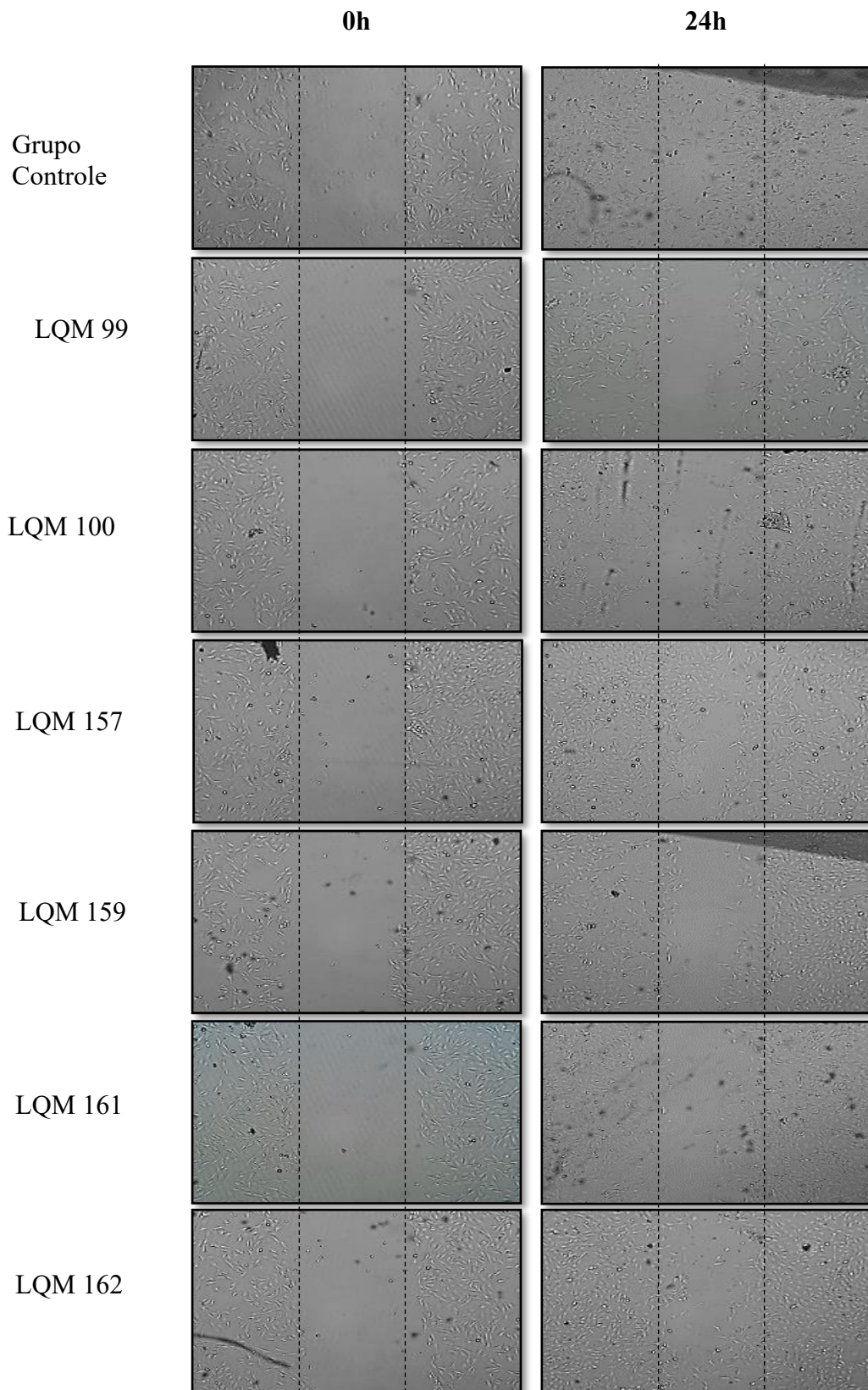
Tabela 6 - Percentuais de migração dos fibroblastos 3T3, na concentração de 10 μ M, para as substâncias LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162

Código	Percentual de migração (%)
Grupo controle	55.17 \pm 7.76
LQM 99	39.17 \pm 3.48
LQM 100	47.06 \pm 3.49
LQM 157	56.23 \pm 5.29
LQM 159	49.44 \pm 4.46
LQM 161	69.02 \pm 12.49
LQM 162	48.50 \pm 7.82

Fonte: autora da pesquisa, 2019.

As imagens obtidas pelo teste em 0h e 24h são demonstradas na figura abaixo (Figura 12).

Figura 12 – Imagens do ensaio de migração dos fibroblastos em 0h e 24h para as substâncias LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162, na concentração de 10 μ M



Fonte: autora da pesquisa, 2019.

6. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível observar a presença de atividade antimicrobiana frente a cepas Gram positivas e Gram negativas para as substâncias LQM 98, LQM 99, LQM 100 e LQM 162.

Os derivados LQM 98, LQM 99 e LQM 100 possuem estruturas análogas, porém apresentam diferenças com relação à posição e quantidade de átomos de cloro em sua estrutura. É possível observar a presença de um *o*-clorofenil no LQM 98. Já o LQM 99 e LQM 100, é constatada a presença de um *o,p*-diclorofenil e de um *m,m*-diclorofenil, respectivamente.

Para as cepas Gram positivas, foi observado que o LQM 98 demonstrou a mesma CIM, ambas de 429 μM , para *S. aureus* e *S. epidermidis*. No entanto, as mudanças estruturais ocorridas nos derivados LQM 99 e LQM 100 propiciaram um aumento da atividade antimicrobiana para essas cepas, ou seja, a adição de mais um átomo de cloro e a sua mudança na posição do anel aromático resultou numa menor demanda da concentração da aminoguanidina para provocar morte bacteriana.

Isso pode ser explicado porque a adição de substituintes halogenados resulta em análogos que são mais lipofílicos, portanto, menos solúveis em água. Conseqüentemente, a adição de mais um cloro na estrutura pode ter aumentado a capacidade da substância em atravessar as membranas lipídicas mais facilmente (MONTES, 2016).

Comparando-se o LQM 99 e o LQM 100 para *S. epidermidis*, a alteração da posição do cloro no anel não promoveu interferência nenhuma na atividade, sendo a CIM de ambos, 74,75 μM . No entanto, para *S. aureus*, esses derivados apresentaram alterações na CIM, com valores de 74,75 μM e 46,72 μM , respectivamente. Diante disso, é constatado que *m,m*-diclorofenil (LQM 100) apresentou uma melhor atividade biológica para *S. aureus*, enquanto o *o,p*-diclorofenil (LQM 99) foi menos potente para essa cepa.

De forma geral, para as linhagens Gram negativas, também foi observado que a adição de mais um átomo de cloro na estrutura promoveu melhora da atividade antimicrobiana. Para *E. coli*, houve pequena diminuição das concentrações inibitórias: o LQM 98 demonstrou CIM de 85,8 μM ; o LQM 99 e o LQM 100 tiveram CIM de 74,75 μM .

Para *P. aeruginosa*, o LQM 99 e o LQM 100 apresentaram suas CIM reduzidas cerca de quatro vezes quando comparados com o LQM 98. Contudo, quando comparados entre si, as mudanças de posição *o,p*-diclorofenil (LQM 99) e *m,m*-diclorofenil (LQM 100) não interferiram nos valores da concentração inibitória, que foi de 214,5 μM para ambos.

Para *S. flexneri*, o LQM 98, que possui apenas um cloro, apresentou sua CIM oito vezes maior que o LQM 99 e quatro vezes maior que o LQM 100. Com relação a posição dos cloros, *o,p*-diclorofenil (LQM 99) demonstrou melhor efeito antimicrobiano que o *m,m*-diclorofenil (LQM 100) para essa cepa.

No que se refere a cepa *E. cloacae*, a presença de apenas um cloro na estrutura do LQM 98 não foi suficiente para promover morte bacteriana. Para as substâncias que apresentam dois cloros em sua estrutura, o *o,p*-diclorofenil (LQM 99) teve melhor comportamento antimicrobiano que o *m,m*-diclorofenil (LQM 100).

Em resumo, foi observado que adição do átomo de cloro provocou diminuição da CIM em todas as cepas, exceto para *E. cloacae*. Para as bactérias Gram positivas, a mudança da posição do cloro nos derivados LQM 99 e LQM 100 só resultou na diminuição da CIM para *S. aureus*, sendo portanto, *m,m*-diclorofenil > *o,p*-diclorofenil > *o*-clorofenil. Para as bactérias Gram negativas, a alteração na posição do cloro para os LQM 99 e LQM 100 não interferiu na atividade para *E. coli* e *P. aeruginosa*, que mantiveram suas CIM iguais, sendo portanto, *o,p*-diclorofenil = *m,m*-diclorofenil > *o*-clorofenil. Já para *E. cloacae* e *S. flexneri*, *o,p*-diclorofenil > *m,m*-diclorofenil > *o*-clorofenil.

As substâncias LQM 157 e LQM 159, LQM 161 e LQM 162 são bioisómeros. O bioisomerismo é uma estratégia em química medicinal para o planejamento racional de substâncias. São realizadas mudanças num composto líder, com o intuito de promover otimização de seu efeito farmacológico (LIMA; BARREIRO, 2005).

Nesses derivados aminoguanidínicos é observada a presença de anéis aromáticos, ou seja, uma rigidificação ou ciclização da estrutura química. A rigidificação é uma estratégia da química medicinal, utilizada para diminuir a liberdade conformacional da molécula, com o objetivo de aumentar a atividade da substância (RASHID et al., 2016). No LQM 157 e no LQM 159 houve rigidificação em anel de sete e substituição de um dos nitrogênios da aminoguanidina por átomos de oxigênio e enxofre. Para o LQM 161 e o LQM 162 houve ciclização em anel de seis.

Os derivados LQM ciclizados apresentam em comum o radical *m,p*-diclorofenil na sua composição. Apesar das semelhanças em seu arcabouço estrutural, as substâncias LQM 157, LQM 159 e LQM 161 não apresentaram atividade para nenhuma cepa. Estruturalmente falando, o LQM 157 e o LQM 159 têm como diferença entre eles apenas a presença de um átomo de oxigênio e de um átomo enxofre, respectivamente.

O LQM 161 e LQM 162 também apresentam estruturas análogas em anel de seis, entretanto, observa-se a ausência de atividade do LQM 161 para todas as linhagens avaliadas.

Já para LQM 162, há presença de atividade para as cepas testadas, sendo a CIM igual para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, de 71,4 μM ; dentre as cepas Gram negativas, essa substância apresentou a menor CIM da presente análise, com valor de 44,7 μM para *S. flexneri*.

A principal diferença entre os derivados LQM 161 e LQM 162 é a substituição de um átomo de carbono por um de nitrogênio na estrutura do LQM 162, que na prática, proporcionou a ele a capacidade de provocar morte bacteriana. A otimização da atividade após essa substituição pode ser explicada pelo fato de o nitrogênio ser um aceptor de ligação de hidrogênio, o que lhe conferiu uma maior capacidade de interação molecular.

A ligação de hidrogênio é uma interação não covalente entre um átomo de grande eletronegatividade, geralmente representados pelo flúor, oxigênio e nitrogênio, que são denominados aceptores de ligação de hidrogênio. Essa interação desempenha um papel importante, sendo essencial, em muitos casos, para propiciar propriedades da molécula (LI; YANG; DING, 2017).

De forma geral, pode-se inferir que as substâncias ciclizadas demonstraram um menor potencial quando comparadas com as não-ciclizadas. O LQM 157 e o LQM 159 apresentam estrutura em anel de sete e ambos não exibiram nenhuma atividade frente as cepas testadas. O LQM 161 e o LQM 162 manifestam estrutura em anel de seis, porém, dentre eles, apenas para o LQM 162 foi evidenciada atividade antibacteriana, a qual, como já destacado anteriormente, foi expressa em todas as estirpes testadas.

Comparando-se os resultados obtidos no presente estudo com a literatura, são observadas análises referindo atividades antimicrobianas de derivados aminoguanidínicos para cepas Gram positivas e Gram negativas, como as citadas abaixo, as quais corroboram com o presente estudo.

Um estudo realizado por Wei e colaboradores (2016), demonstrou que derivados de chalconas contendo aminoguanidinas que possuíam em sua estrutura substituintes halogenados, como flúor, cloro e bromo e ainda substituintes metálicos, apresentaram atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, com CIM variando entre 2 e 64 $\mu\text{g/ml}$. Esse intervalo se assemelha com os valores encontrados na presente análise para as mesmas cepas.

Um depósito de pedido de patente BR 10/2015/003322-2 (A2), que trata de composições farmacêuticas contendo derivados de aminoguanidina com atividade antisséptica, demonstrou que soluções que continham como princípio ativo as guanilhidrazonas, foram eficientes na redução das unidades formadoras de colônia (UFC) para as cepas *S. aureus* e *S. epidermidis*. A

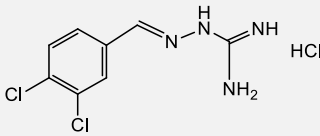
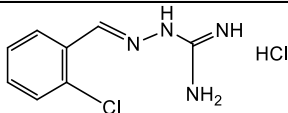
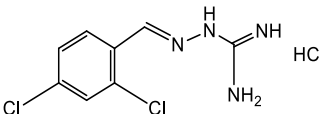
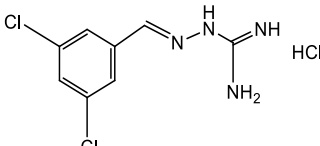
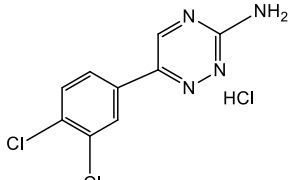
solução degermante da aminoguanidina foi preparada a 2% (20.000 µg/ml) e a solução alcoólica tinha concentração de 5000 µg/ml. A ação desse produto se prolongou por até nove horas na pele, efeito comparável ao comportamento da clorexidina (BARRETO et al., 2015).

Um estudo realizado por Shrestha e colaboradores (2017), que avaliou a atividade antimicrobiana de bis(*N*-amidinohidrazonas) e *N*-(amidino)-*N'*-aryl-bishidrazonas frente a *E. cloacae*. Todas as substâncias avaliadas apresentaram atividade frente a essa bactéria, com o intervalo de CIM variando entre 52,9 a 235 µg/ml. O destaque de melhor atividade foi para a aminoguanidina 4A, a qual apresentou CIM de 52,9 µg/ml. Esses resultados corroboram com a presente pesquisa, visto que os valores inibitórios encontrados para esta análise estão dentro desse intervalo.

Aminoguanidinas hidazonas mostraram eficiente atividade antibacteriana para cepas de *S. aureus* que expressavam a enzima NorA, a qual confere resistência frente a norfloxacina. Os valores de CIM expressos para as substâncias cloridrato de 2-(3,5-di-*tert*-butil4-hidroxibenzilideno) hidrazina carboximidamida, cloridrato de 2-(bifenil-4-ilmetileno) hidrazina carboximidamida e cloridrato de 2-(3,4- diclorobenzilideno) hidrazina carboximidamida foram de 16 µg/ml , 16 µg/ml e 32 µg/ml, respectivamente (DANTAS et al., 2018), valores que também abarcam o intervalo de atividade do presente estudo para alguns derivados aminoguanidínicos.

Ainda no que se refere à avaliação antimicrobiana, pode-se fazer um comparativo dos resultados obtidos por Veríssimo (2017) para a substância mais relevante de seu estudo, o LQM 17, e as aminoguanidinas obtidas para a presente análise, todas derivadas do LQM 17 (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação dos resultados obtidos para atividade antimicrobiana entre o LQM 17 e os derivados LQM 98, LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 frente às cepas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* em micromolar (μM) e [micrograma por mililitro ($\mu\text{g/ml}$)]

Código	Estrutura Química	Concentração Inibitória Mínima			
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		μM [$\mu\text{g/ml}$]	μM [$\mu\text{g/ml}$]	μM [$\mu\text{g/ml}$]	μM [$\mu\text{g/ml}$]
LQM 17		1,42 [0,38]	13,68 [3,66]	58,16 [15,56]	109,51 [29,30]
LQM 98		429,0 [100]	429,0 [100]	85,8 [20]	858,0 [200]
LQM 99		74,75 [20]	74,75 [20]	74,75 [20]	214,5 [50]
LQM 100		46,72 [12,5]	74,75 [20]	74,75 [20]	214,5 [50]
LQM 162		71,54 [20]	71,54 [20]	71,54 [20]	71,54 [20]

Fonte: Veríssimo (2017), autora da pesquisa, 2019.

De forma geral, é observado que, exceto o derivado LQM 162 para a cepa *P. aeruginosa*, as concentrações inibitórias obtidas na presente análise foram maiores que as demonstradas para a aminoguanidina LQM 17, sendo, portanto, a atividade antibacteriana do LQM 17 melhor que aquelas encontradas para as modificações estruturais propostas.

Quando se observa a CIM do LQM 17 para *S. aureus* e *S. epidermidis*, percebe-se a necessidade de uma concentração bem pequena dessa substância para promover morte celular. Isso não é constatado para as aminoguanidinas da presente análise, pois os valores de suas CIM precisaram ser consideravelmente maiores para os derivados LQM 98, LQM 99, LQM 100 e LQM 162 para matar essas mesmas cepas. Nesse sentido, as alterações estruturais propostas

para os derivados aminoguanidínicos diminuíram a potência dos derivados frente as bactérias Gram positivas.

Ao comparar os desfechos do presente estudo com os do LQM 17 para *E. coli*, percebe-se que os resultados de Veríssimo (2017) foram melhores que obtidos nesta análise. O LQM 17 demonstrou CIM de 58,16 μM ; já os derivados LQM 99 e LQM 162 exibiram CIM de 71,54 μM ; o LQM 100 apresentou CIM de 74,75 μM e o LQM 98, CIM de 85,8 μM . Isso demonstra que as modificações propostas de rigidificação e mudança na posição do cloro diminuíram a potência das aminoguanidinas para *E. coli*.

Já para *P. aeruginosa*, tanto nesta análise, quando na de Veríssimo (2017), apresentou os maiores valores da CIM obtidos. A grande resistência dessa bactéria Gram negativa pode ser explicada porque a membrana externa de lipopolissacarídeo encontrada nessa cepa, dificulta a passagem de moléculas, protegendo as células de substâncias que podem ser nocivas para elas. No caso de *P. aeruginosa*, sua membrana externa é 100 vezes menos permeável que a de *E. coli* (MORSE; MEITZNER et al, 2013).

Para *P. aeruginosa*, as concentrações do LQM 17 foram bem menores que a dos derivados LQM 98, LQM 99 e LQM 100. No entanto, para o LQM 162, o valor da CIM foi aparentemente menor que o do LQM 17, revelando que a rigidificação da estrutura em anel de seis e a substituição do carbono pelo o nitrogênio, possivelmente promoveu um aumento da potência antimicrobiana na aminoguanidina.

Esse resultado deve ser destacado com grande importância, visto que *P. aeruginosa* é uma bactéria ubiqüitária e que provoca diversos tipos de infecções. Além disso, é um dos microrganismos que mais apresenta mecanismos de resistência, sendo sua terapêutica muito difícil e custosa (AZAM; KHAN, 2018).

No que se refere ao ensaio citotóxico para fibroblastos, as concentrações utilizadas dos derivados aminoguanidínicos foram de 10 μM e 100 μM . Foi observado que, na concentração de 10 μM , os derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159 e LQM 162 não foram citotóxicos; já o LQM 161 foi levemente citotóxico. Na concentração de 100 μM , as substâncias LQM 157, LQM 159 e LQM 161 não foram citotóxicas; porém o LQM 99, LQM 100 foram moderadamente citotóxicos e o LQM 162 apresentou citotoxicidade severa.

De uma maneira geral, os antibióticos são substâncias tóxicas para o organismo humano. Os antimicrobianos que tem por alvo a síntese proteica, como os aminoglicosídeos, provocam ototoxicidade e nefrotoxicidade. As fluorquinolonas, as quais atuam na produção de ácidos nucleicos, são associadas à doenças cardiovasculares, tendinopatia e fototoxicidade. As polimixinas, que agem na membrana citoplasmática, estão ligadas à neurotoxicidade e

nefrotoxicidade. Até mesmo os inibidores da síntese de parede celular, os quais são considerados os antibióticos mais seguros e específicos, promovem diversos efeitos adversos, como hepatotoxicidade, neutropenia, encefalopatia e neurotoxicidade (YILMAZ; ÖZCENGİZ, 2017).

No entanto, mesmo com a possibilidade dessas consequências prejudiciais, o uso de antimicrobianos é justificável, apesar de sua toxicidade, visto que as infecções são uma das principais causas de mortalidade do mundo (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010) e necessitam ser tratadas por esses tipos de fármaco. Além disso, tipicamente, a maioria das terapêuticas feitas com esses medicamentos são curtas, durando apenas alguns dias (LEWIS, 2013).

Diante disso, apesar de alguns derivados aminoguanidínicos da presente análise apresentarem alta citotoxicidade para os fibroblastos, isso pode ser tolerado, principalmente quando se considera os efeitos adversos provocados pela toxicidade dos antibióticos que já estão no mercado.

Deve-se destacar ainda que, os derivados aminoguanidínicos que não foram citotóxicos na concentração de 100 μM , foram os mesmos que não apresentaram atividade antimicrobiana para as cepas avaliadas.

Ao se comparar a morte bacteriana com a morte dos fibroblastos percebe-se que o LQM 99 apresentou CIM de 74,75 μM para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*; o LQM 100 teve CIM de 74,75 para *S. epidermidis* e *E. coli* e de 46,75 μM para *S. aureus*; o LQM 162 apresentou CIM de 71,54 μM para essas três cepas e ainda para *P. aeruginosa*. Os resultados do ensaio citotóxico demonstraram citotoxicidades mais severas apenas na concentração de 100 μM , havendo, portanto, ainda um intervalo entre as concentrações de morte bacteriana e morte fibroblástica.

Contudo, para a cepa *P. aeruginosa*, a CIM para os derivados LQM 99 e LQM 100 foi de 214,5 μM , valor muito mais elevado que a concentração utilizada no ensaio do MTT, que para 100 μM demonstrou moderada citotoxicidade. A partir disso, devem-se realizar estudos buscando entender o mecanismo de ação desses derivados, procurando conhecer se a morte bacteriana provocada por essas substâncias está relacionada com a citotoxicidade ou com outra forma de atuação.

Ainda sobre o ensaio do MTT, está claro que o presente estudo realizou a avaliação da viabilidade celular para fibroblastos, pois como foi destacado anteriormente, eles possuem um papel fundamental no processo cicatricial. Veríssimo (2017) também analisou a viabilidade celular da guanilhidrazona LQM 17, no entanto, utilizou macrófagos. Apesar de serem tipos

celulares diferentes, destaca-se aqui que as mudanças estruturais realizadas no presente estudo para o LQM 17 promoveram melhorias nas viabilidades celulares.

Na concentração de 10 μM , o percentual de viabilidade celular dos macrófagos para o LQM 17 foi de 74,9%, sendo considerado levemente citotóxico (VERÍSSIMO, 2017). No presente estudo, com exceção do derivado LQM 161, que na concentração de 10 μM teve percentual de 89,05% (levemente citotóxico), os derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 162 apresentaram percentuais de viabilidade maiores que 90%, sendo considerados não citotóxicos. Apesar de serem tipos celulares diferentes, houve melhorias com relação à viabilidade de células.

Com relação ao controle positivo, foi adotado ciprofloxacino, uma fluorquinolona de terceira geração que possui grande atividade e amplo espectro bacteriano devido ao seu mecanismo de ação, o qual é voltado para inibição da síntese de ácidos nucleicos (NAQVI et al., 2018).

Um estudo avaliou a viabilidade celular de fibroblastos tratados com ciprofloxacino em diferentes concentrações num período de 24 horas. Foi observado que nas concentrações de 5 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, os percentuais de viabilidade foram de 78,6% e 63,6%, respectivamente, sendo considerados levemente citotóxicos. Na concentração de 150 $\mu\text{g/ml}$, a viabilidade celular foi de 37,5%, ou seja, moderadamente citotóxico. E no valor de 300 $\mu\text{g/ml}$, a citotoxicidade foi severa, com percentual de 27,2% (FERREIRA, 2007).

Há ainda estudos que relacionam a atuação do ciprofloxacino nos processos de migração e proliferação celulares. Ensaio feito com culturas de fibroblastos de tendão canino demonstrou que esse antibiótico promoveu decréscimos significativos na proliferação dessas células, além de diminuição na síntese de colágeno e proteoglicanos (WILLIAMS et al., 2000). Outra análise afirmou que fibroblastos da córnea humana tiveram sua migração retardada pelo uso de ciprofloxacino e outras fluorquinolonas (CHEN; TSAI; CHENG, 2016).

Com isso, percebe-se que esse antibiótico, apesar de sua vasta ação e utilidade, apresentou interferência negativa às células saudáveis. Em todas as concentrações avaliadas no estudo de Ferreira (2007), ciprofloxacino apresentou algum grau de citotoxicidade. Além disso, esse antibiótico também interferiu em processos importantes à cicatrização, como migração e proliferação celulares, demonstrando que é preciso sempre considerar o custo-benefício de um fármaco diante de seus impactos.

Na literatura, não são encontrados experimentos que avaliem a citotoxicidade de aminoguanidinas para fibroblastos, mas há para outros tipos de células eucariontes. Um ensaio avaliou a citotoxicidade de aminoguanidinas para macrófagos da linhagem J774. Os resultados

obtidos para um análogo das substâncias utilizadas no presente estudo, o cloridrato de (E)-2-(4'-clorobenzilideno)hidrazinocarboximidamida, que possui em sua estrutura um *p*-clorofenil, foi de ausência de citotoxicidade na concentração de 10 μ M. No entanto, para as concentrações de 100 μ M e 1000 μ M, a viabilidade celular foi extremamente baixa, corroborando com os desfechos do LQM 99, LQM 100 e LQM 162 (AQUINO, 2016).

Em outra análise também realizada para macrófagos J774, foi observado que aminoguanidinas hidrazonas que possuíam estruturas análogas ao deste estudo, como substituintes *o-o*-diclorofenil e *m*-clorofenil, não foram tóxicas na concentração de 10 μ M, porém, tiveram citotoxicidade intermediária ou elevada para em 100 μ M e 1000 μ M, confirmando os resultados obtidos neste estudo (SARMENTO, 2016).

Para o teste do *scratch assay*, a concentração adotada dos derivados foi de 10 μ M, visto que nenhuma substância demonstrou elevada citotoxicidade nessa concentração. No entanto, o tratamento das células com os derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 não apresentou efeitos significativos na migração dos fibroblastos quando comparados ao controle positivo, demonstrando que esses derivados não possuem capacidade de promover migração celular.

Não são encontrados na literatura a demonstração do comportamento de aminoguanidinas (AG) especificamente para migração de fibroblastos *in vitro* e nesse sentido, a presente análise é inovadora. Estudos referem o uso de derivados aminoguanidínicos favorecendo o processo de cicatrização, como os citados abaixo, e inclusive, promovendo a migração de outros tipos celulares, como neutrófilos. No entanto, esses resultados não corroboram com a presente análise.

Veríssimo (2017) afirma que o uso de derivados aminoguanidínicos promoveu a diminuição no tempo de cicatrização de feridas infectadas *in vivo* em dois dias, quando comparados ao grupo controle, que usou gentamicina.

Em outra análise, foi avaliado o efeito da administração oral de aminoguanidina na formação do tecido de granulação e angiogênese em ratos diabéticos. Foi demonstrado que a AG possui potencial valor terapêutico no manejo da cicatrização de feridas diabéticas, já que são poderosas agentes anglicantes e auxiliam a contornar os efeitos nocivos dessa doença no reestabelecimento de lesões (TEIXEIRA et al., 1999).

Tian e colaboradores (2013) avaliaram o efeito cicatrizante da aminoguanidina em neutrófilos de ratos diabéticos. Foi utilizado um creme contendo AG, o qual foi aplicado sobre a lesão. Demonstrou-se que o uso profilático dessa substância promoveu a migração de neutrófilos, a correção da liberação de suas citocinas inflamatórias e a diminuição do apoptose

celular, devido ao bloqueio da deposição dos produtos da glicação avançada, provocando o melhoramento do microambiente e auxiliando na cicatrização da ferida.

Assim sendo, estudo em questão demonstrou que derivados aminoguanidínicos do LQM 17 apresentaram atividade antimicrobiana frente as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* e *S. flexneri*. Foi observado também que, para a concentração de 10 μM , os derivados LQM avaliados não demonstraram citotoxicidade ou foram levemente citotóxicos para fibroblastos. Com relação ao teste do *scratch assay*, os derivados avaliados não exibiram capacidade de promover migração celular de fibroblastos.

7. CONCLUSÃO

A presente análise explorou, por meio de testes *in vitro*, os potenciais biológicos antimicrobiano e de migração celular de derivados aminoguanidínicos. As aminoguanidinas LQM 98, LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 são derivados do LQM 17. Os resultados alcançados demonstram que os derivados aminoguanidínicos LQM 99, LQM 100 e LQM 162 apresentaram atividade frente a espécies Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e frente a espécies Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella flexneri*.

O LQM 100, que possui o radical *m,m*-diclorofenil, e o LQM 162, que é ciclizado, merecem destaque nesta análise, pois apresentaram as menores CIM do estudo, para *S. aureus* (46,72 μM) e *S. flexneri* (44,7 μM), respectivamente. Já os derivados LQM 157, LQM 159, LQM 161 não demonstraram atividade para nenhuma bactéria e o LQM 98 não foi ativo para *E. cloacae*, apesar de ter sido para as demais cepas avaliadas.

As modificações estruturais propostas para o LQM 17 com relação as substâncias da presente análise, diminuíram a eficiência antimicrobiana para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Já para o derivado LQM 162 foi verificada uma possível otimização da atividade para *P. aeruginosa* quando comparado ao LQM 17.,

Com relação à viabilidade celular para fibroblastos, verificou-se que na concentração de 10 μM nenhum derivado aminoguanidínico foi demasiadamente citotóxico. Na concentração de 100 μM , os derivados LQM 99, LQM 100 e LQM 162 demonstraram elevada citotoxicidade. Em contraste, os derivados LQM 157, LQM 159 e LQM 161 não foram citotóxicos na concentração de 100 μM .

Os derivados LQM 99, LQM 100, LQM 157, LQM 159, LQM 161 e LQM 162 não apresentaram comportamento significativo de migração celular de fibroblastos na concentração de 10 μM quando comparados ao grupo controle.

A partir do exposto, verifica-se a necessidade de se realizar novas modificações estruturais nos derivados aminoguanidínicos, visando a otimização das atividades avaliadas. Sugere-se também novas análises voltadas para o entendimento do mecanismo de ação antibacteriano dos derivados LQM 98, LQM 99, LQM 100 e LQM 162.

Ademais, para o derivado LQM 162, por ter demonstrado bons resultados para cepa *P. aeruginosa* e se apresentado como severamente citotóxico na concentração de 100 μM , sugere-se ainda que novos ensaios de viabilidade celular sejam realizados com tipos celulares de outros tecidos, procurando avaliar o comportamento de diferentes células para essa substância.

REFERÊNCIAS

- AJDACIC, V. et al. Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhydrazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.24, p.1277–1291, 2016.
- 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.H.V. **Síntese de análogos estruturais de aminoguanidinoidrazonas 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**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.
- ANDREANI, A. et al. Potential Antitumor Agents. 34.(1) Synthesis and Antitumor Activity of Guanylhydrazones from Imidazo[2,1-*b*]thiazoles and from Diimidazo[1,2-*a*:1,2-*c*]pyrimidine. **Anticancer Research**, v.24, p. 203-212, 2004.
- AZAM, M.W.; KHAN, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 2018.
- BAINBRIDGE, P. Wound healing and the role of fibroblasts. **Journal of Wound Care**, v. 22, n. 8, p. 407-12, 2013.
- BAIRWA, R. et al. Novel molecular hybrids of cinnamic acids and guanylhydrazones as potential antitubercular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p. 1623–1625, 2010.
- BARRETO, T.H.L et al. **Composição farmacêutica contendo derivados de aminoguanidina com atividade antisséptica**. Depositante: Universidade Federal de Alagoas. BR 102015003322-2 (A2). Depósito: 30 jan. 2015.
- BLAIR, J.M.A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature**, v. 13, p. 42-51, 2015.
- BRETADO-ARAGÓN, L.A. et al. Compósitos de nanopartículas de prata-quitosano: una fuente potencial de nuevas terapias antimicrobianas. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 47, n.4, p. 7-25, 2016.
- BORGES, M.Z.; 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, p. 925–929, 2004.
- CARLSSON, F.H.H.; CHARLSON, A.J.; WATTON, E.C. The biological activity of some guanylhydrazones and thiosemicarbazones of aliphatic carbonyl compounds. **Carbohydrate Research**, v. 36, p.359-368, 1974.

CARROLL, K.C. The Staphylococci. In: BROOKS, G.F et al. **Medical microbiology**. 26 edition. United States of America: Appleton & Lange, 2013.

CEFALU, J.E.; BARRIER, K.M.; DAVIS, A.H. Wound Infections in Critical Care. **Critical Care Nursing Clinics**, v. 29, n.1, p. 81–96, 2017.

CHELLAT, M.F.; RAGUZ, L.; RIEDL, R. Targeting Antibiotic Resistance. **Angewandte Medicinal Chemistry**, v.55, p.6600 – 662, 2016.

CHEN, T.C; TSAI, T.Y; CHANG, S.W. Molecular mechanism of fluoroquinolones modulation on corneal fibroblast motility. **Experimental Eye Research**, v. 145, p. 10-6, 2016.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 3. ed. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

COURDEROT-MASUYER, C. et al. Antioxidant properties of aminoguanidine. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.13, p. 535-540, 1999.

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

CUNHA, S. et al. Guanylation of Thiosemicarbazones: A New Synthetic Route to Polysubstituted Guanylhydrazones with Antimicrobial Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 627-634, 2009.

DAHL, J.E; FRANGOU-POLYZOIS, M.J; POLYZOIS, G.L. *In vitro* biocompatibility of denture relining materials. **Gerodontology**, v.23, n.1, p.17-22, 2006.

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.

DAVIN-REGL, A; PAGÈS, J.M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 392, p.1-10, 2015.

DELCOUR, A.H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. **Biochim Biophys Acta**, v.1794, n.5, p. 808–816, 2009.

DORON, S; GORBACH, S.L. **Bacterial Infections: Overview**. 2008.

ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, p. 90-101, 2016.

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.

FENG, Z.V. et al. Impacts of gold nanoparticle charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Chemical Sciences**, v.6, p. 5186–5196, 2015.

FERREIRA, M.B. **Citotoxicidade em relação à concentração e tempo experimental de antibióticos utilizados na terapia endodôntica**. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2007.

FOYE, W.O. et al. Synthesis and Biological Activity of Guanylhydrazones of 2- and 4-Pyridine and 4-Quinoline Carboxaldehydes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.79, n.6, p. 527 – 530, 1990.

FRANÇA, P.H.B. **Planejamento e síntese de novos derivados aminoguanidínicos visando à atividade leishmanicida**. 2014. 180f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

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

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOURTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v.10, p. 369-378, 2017.

FUKAMI, K.; COOPER, M.E.; FORBES; J.M. Agents in development for the treatment of diabetic nephropathy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.14, n.3, p.279-294, 2005.

GADAD, A.K. et al. Synthesis and antibacterial activity of some 5 guanylhydrazone/thiocyanato-6- arylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.35, p. 853–857, 2000.

GAHL, W.A; PITOT, H.C. Reversal by aminoguanidine of the inhibition of proliferation of human fibroblasts by spermidine and spermine. **Chemical Biological Interactions**, v.22, p. 91-98, 1978.

GANTWERKER, E.A.; HOM, D.B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.19, n.3, p. 441-53, 2011.

GIEDRAITIENĖ, A. et al. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **Medicina (Kaunas)**, v.47, n.3, p.137-46, 2011.

GILL, S.R. et al. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n.7, p. 2426–2438, 2005.

GRADA, A. et al. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v.137, n.2, p. 11 – 16, 2017.

GOTSULYAK, N.Y. et al. Optimization of cell motility evaluation in scratch assay. **Biopolymers and Cell**, v.30, n.3, p. 223–28, 2014.

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.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.667-679, 2010.

GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219 – 229, 2010.

GOEMANS, C.; DENONCIN, K.; COLLET, J.F. Folding mechanisms of periplasmic proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1843, p. 1517 – 1528, 2014.

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

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.27, p.4221–4228, 2017.

GREGORY, J.E.; STARR, S.P.; OMDAL, C. Letter: wound infection with *Shigella flexneri*. **The Journal of Infectious Disease**, v129, n.5, p. 602-4, 1974.

HADDADI, R.; TAMRI, P.; JOONI, F. J. *In vitro* wound healing activity of *Scrophularia striata* hydroalcoholic extract. **South African Journal of Botany**, v.121, p. 505–509, 2019.

HAMMOUD, H. et al. Aminoguanidine hydrazone derivatives as non-peptide NPFF1 receptor antagonists reverse opioid induced hyperalgesia. **ACS Chemical Neuroscience**, v.21, n.9, p. 2599-2609, 2018.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: o estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v.27, n.1, p. 27-36, 2013.

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**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

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, pp.193 – 197, 2011.

ITOH, T.; MASE, T. Direct synthesis of hetero-biaryl compounds containing an unprotected NH₂ group via Suzuki-Miyaura reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 20, p. 3573–3577, 2005.

JENISSON, A.V.; VERMA, N.K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, n.1, p.43-58, 2004.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.2, p.123-40, 2004.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for Clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v.33, n.3, p. 300-305, 2017.

KIMBRELL, M.R. et al. Comparison of the Immunostimulatory and Proinflammatory Activities of Candidate Gram-Positive Endotoxins, Lipoteichoic Acid, Peptidoglycan, and Lipopeptides in Murine and Human Cells. **Immunology Letters**, v.118, n.2, p. 132–141, 2008.

KLEINSCHMIDT, S. et al. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. **Future Microbiology**, v.10, n. 11, p. 1859–1879, 2015.

KUMAR, A. et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v.307, p.481–489, 2017.

LANDÉN, N.X.; LI, D.; STAHL, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p.3861–3885, 2017.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic Discovery. **Nature**, v.12, p.371-387, 2013.

LI, Y., YANG, Y., DING, Y. The new competitive mechanism of hydrogen bonding interactions and transition process for the hydroxyphenyl imidazo [1, 2-a] pyridine in mixed liquid solution. **Nature scientific reports**, v. 7, n. 1574, p. 1-15, 2017.

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. 239-33, 2007.

LIEBER, E.; SMITH, G.B.L. The chemistry of aminoguanidine and related substances. **Chemical Reviews**, v.25, p. 213–271, 1939.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, n. 23-49, 2005.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. The New England Journal of Medicine, v.339, n.8, p. 520-32, 1998.

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, v.45, p.622-648, 2017.

MESSEDER, J.C; TINOCO, L.W; FIGUEROA-VILLAR, J.D. 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.

MONTES, R.C. **Amidas halogenadas: reações de acoplamento e investigação *in silico* da atividade antimicrobiana**. 2016. Tese (Doutorado em produtos naturais) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de ciências da saúde. Paraíba, 2016.

MORAND, A.; MORAND, J.J. *Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v.144, n.11, p.666-675, 2017.

MORSE, S.A., MEITZNER, T.A. Cell Structure. In: BROOKS, G.F et al. **Medical microbiology**. 26 edition. United States of America: Appleton & Lange, 2013.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURPHREE, R.W. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics of North America**, v.52, n.3, p. 405-417, 2017.

NANGINO, G.O. et al. Financial impact of nosocomial infections in the intensive care units of a charitable hospital in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 4, p. 357-361, 2012.

NAQVI, S.A.R. et al. Ciprofloxacin: from infection therapy to molecular imaging. **Molecular Biology Reports**, v.45, n.5, p.1457-1468, 2018.

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.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASE (NIAID). **Antibacterial resistance program: current status and future directions**. 2014. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/arstrategicplan2014.pdf>. Acesso em 30 de outubro de 2018.

NGUYEN, P et al. Structure–Activity Relationship Study around Guanabenz Identifies Two Derivatives Retaining Antiprion Activity but Having Lost α 2-Adrenergic Receptor Agonistic Activity. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 1075–1082, 2014.

NILSON, B.O. Biological effects of aminoguanidine: An update. **Inflammation research**, v.48, p. 509–515, 1999.

OLIVEIRA, A.C. et al. Perfil dos microrganismos associados à colonização e infecção em Terapia Intensiva. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v.7, n.2, p. 101-106, 2017.

PRESTINACI, F.; PEZZOTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v.109, n.7, p. 309-318, 2015.

QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. **Chinese Journal of Traumatology**, v. 20, p. 89-193, 2017.

RACZYNSKA, E. D. et al. Superbases in the gas phase. Part II. Further extension of the basicity scale using acyclic and cyclic guanidines. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 7, p. 725–733, 1994.

RADLINSK, L.; CONLON, B.P. Antibiotic efficacy in the complex infection environment. **Current Opinion in Microbiology**, v.42, p.19–24, 2018.

RASHID, U. et al. Structure based medicinal chemistry-driven strategy to design substituted dihydropyrimidines as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.10, n. 115, p.230-44, 2016.

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.

SALEH, K.; SÖNNERGREN, H.H. **Control and treatment of infected wounds**. *Wound Healing Biomaterials*, p. 107-115, 2016.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, 2016.

SARMENTO, P.A. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of guanidinederivatives with potential hypoglycemic activity. **BMC Proceedings**, v.8, n.4, 2014.

SARMENTO, P.A. **Avaliação da atividade antidiabética e/ou inibidora sobre os produtos finais da glicação avançada dos derivados aminoguanidínicos em ratos diabéticos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

SCHLEIFER, K.H.; KANDLER, O. Peptidoglycan .Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. **Bacteriological reviews**, v.36, n.4, p. 407-477 Vol. 36, 1972.

SCHROEDER, G.N; HILBI, H. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 134–156, 2008.

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

SILVA, F.P.L. et al. Synthesis and Anticancer Activities of Novel Guanylhydrazone and Aminoguanidine Tetrahydropyran Derivatives. **Molecules**, v.21, n. 671, p. 2 -11, 2016.

SIMÕES, D. et al. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.127, p. 130–141, 2018.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. The physiology of wound healing. *Surgery*, v.35, n.9, p. 473–477, 2017.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, p.254–267, 2014.

TEIXEIRA, A.S. et al. Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. **Inflammation**, v. 23, n. 6, 1999.

TIAN, M. et al. Effect of Aminoguanidine Intervention on Neutrophils in Diabetes Inflammatory Cells Wound Healing. **Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes**, v.121, p. 635–642, 2013.

VADILLO-RODRIGUEZ, V.; DUTCHER, J.R. Viscoelasticity of the bacterial cell envelope. **Soft Matter**, v.7, p. 4101–4110, 2011.

VERÍSSIMO, R.C.S.S. **Composição farmacêutica para tratamento de feridas infectadas contendo derivados de aminoguanidina**. BR. Pat. 102015003317-6 A2. 2017. 26p.

YILMAZ, Ç; ÖZCENGİZ, G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux Pumps, **Biochemical & Pharmacology**, v.1, n.133, p.43 – 6, 2017

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

WILLIAMS, R.J.3rd et al. The effect of ciprofloxacin on tendon, paratenon, and capsular fibroblast metabolism. **The American Journal of Sports Medicine**, v.3, p. 364-9, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: WHO; 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Geneva: WHO; 2017. Disponível em:http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short-Summary_25Feb-ET_NM_WHO. Acesso em 31 de outubro de 2018.

WULFF, B.C.; WILGUS, T.A. Mast cell activity in the healing wound: More than meets the eye? **Experimental Dermatology**, v.22, n.8, p. 507–510, 2013.

ANEXO A

Conversão de unidades de microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) para micromolar (μM) considerando-se as concentrações estoque de $40 \mu\text{g/mL}$ e $400 \mu\text{g/mL}$ utilizadas no teste antimicrobiano.

Quadro 3 - Concentrações dos derivados aminoguanidínicos para o teste antimicrobiano após conversão de unidades de microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) para micromolar (μM) considerando-se concentração estoque de $40 \mu\text{g/ml}$

DILUIÇÃO SERIADA (μM)	DERIVADOS AMINOGUANIDÍNICOS						
	LQM 98	LQM 99	LQM 100	LQM 157	LQM 159	LQM 161	LQM 162
Linha A	85,8	74,75	74,75	58,37	55,76	72,31	71,54
Linha B	42,9	37,37	37,37	29,18	27,88	36,15	35,77
Linha C	21,45	18,68	18,68	14,54	13,94	18,07	17,88
Linha D	10,72	9,34	9,34	7,29	6,97	9,03	8,94
Linha E	5,36	4,67	4,67	3,64	3,48	4,51	4,47
Linha F	2,68	2,33	2,33	1,82	1,74	2,25	2,23
Linha G	1,34	1,16	1,16	0,91	0,87	1,12	1,11
Linha H	0,67	0,58	0,58	0,45	0,43	0,56	0,55

Fonte: autora da pesquisa, 2019.

Quadro 4 - Concentrações dos derivados aminoguanidínicos para o teste antimicrobiano após conversão de unidades de microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) para micromolar (μM) considerando a concentração estoque de $400 \mu\text{g/ml}$

DILUIÇÃO SERIADA (μM)	DERIVADOS AMINOGUANIDÍNICOS						
	LQM 98	LQM 99	LQM 100	LQM 157	LQM 159	LQM 161	LQM 162
Linha A	858	747,5	747,5	583,7	557,6	723,1	715,4
Linha B	429	373,7	373,7	291,8	278,8	361,5	357,7
Linha C	214,5	186,8	186,8	145,4	139,4	180,7	178,8
Linha D	107,2	93,4	93,4	72,9	69,7	90,3	89,4
Linha E	53,6	46,7	46,7	36,4	34,8	45,1	44,7
Linha F	26,8	23,3	23,3	18,2	17,4	22,5	22,3
Linha G	13,4	11,6	11,6	9,1	8,7	11,2	11,1
Linha H	6,7	5,8	5,8	4,5	4,3	5,6	5,5

Fonte: autora da pesquisa, 2019.