



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E**  
**MOLECULAR**

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIBACTERIANOS DO COMPOSTO 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona SOBRE LINHAGENS DE *Pseudomonas aeruginosa*

**ROSÂNGELA TARGINO PEREIRA**

**JOÃO PESSOA-PB**  
**2024**

**ROSÂNGELA TARGINO PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIBACTERIANOS DO COMPOSTO 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona SOBRE LINHAGENS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação de Mestrado a ser apresentado ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPB para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Rafael Almeida Travassos

**JOÃO PESSOA-PB  
2024**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

P436a Pereira, Rosângela Targino.

Avaliação dos efeitos antibacterianos do composto  
6h,12h-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona sobre  
linhagens de pseudomonas aeruginosa / Rosângela Targino  
Pereira. - João Pessoa, 2024.

37 f. : il.

Orientação: Rafael Almeida Travassos.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Bioativos sintéticos. 2. Atividade bactericida.  
3. Compostos antipseudomonas. I. Travassos, Rafael  
Almeida. II. Título.

UFPB/BC

CDU 561.23(043)



Ata da Sessão Pública da Defesa de Dissertação de Mestrado da discente **Rosângela Targino Pereira**, candidata ao Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular - Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

1 Aos vinte e seis dias do mês de abril de dois mil e vinte e quatro, às dez horas, reuniram-se,  
2 no Auditório da Direção de Centro do CCEN, os membros da Banca Examinadora, composta  
3 pelos Professores Doutores: Rafael de Almeida Travassos (Orientador / Presidente), Ulrich  
4 Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador interno) e Marcelo Moreno (Examinador externo)  
5 constituída para examinar a candidata **Rosângela Targino Pereira** ao grau de Mestre em  
6 Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.  
7 Iniciando a sessão, na qualidade de Presidente, o Professor Doutor Rafael de Almeida  
8 Travassos comunicou aos presentes a finalidade da reunião. A seguir, concedeu a palavra para  
9 que a candidata fizesse, oralmente, a exposição do trabalho intitulado “*AVALIAÇÃO DOS*  
10 *EFEITOS ANTIBACTERIANOS DO COMPOSTO 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-*  
11 *diona SOBRE LINHAGENS DE Pseudomonas aeruginosa*”. Concluída a exposição, a  
12 candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que avaliou, julgou e proferiu o seguinte  
13 parecer: “**aprovada**”. Ao final da sessão, o orientador preencheu a Ficha de Avaliação e  
14 emitiu o Relatório Final, para serem encaminhados ao Colegiado deste Programa para  
15 homologação. E, para constar, eu, Rafael de Almeida Travassos, Presidente desta sessão,  
16 lavrei a presente ata, que assino junto com os membros da Banca Examinadora.

Rafael de Almeida Travassos  
Orientador / Presidente

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES  
Data: 06/05/2024 13:35:12-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
Examinador Interno

Marcelo Moreno  
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ROSANGELA TARGINO PEREIRA  
Data: 29/04/2024 10:21:32-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rosângela Targino Pereira  
Discente

## **Dedicatória**

Aos profissionais que buscam todos os dias novas soluções para um mundo melhor, a partir da ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente a Deus pela jornada cumprida até aqui, que seja possível saúde e forças para continuar.

Aos familiares e amigos pelo apoio que dedicaram a mim.

Ao professor Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, sempre gentil e atencioso, dedicando-se a ajudar-me quando preciso. Como também o professor Marcelo Moreno, que de longas datas se disponibiliza a contribuir para minha formação profissional, e crescimento pessoal, obrigada por todos os seus conselhos.

Ao meu querido orientador, professor Rafael Travassos, que muito ajudou não só durante o mestrado com suas orientações, mas também na conclusão de curso do bacharelado, sempre paciente e atencioso. Foi imprescindível sua contribuição para que eu pudesse manejar as duas atividades. Lhe agradeço de coração.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, dos quais tive a honra de receber seus ensinamentos, bem como aos bons colegas feitos nesse período.

Se torna difícil mencionar o nome de todas as pessoas que contribuiriam de forma significativa, não só na jornada acadêmica, diga-se de passagem um pouco tortuosa, mas também na vida. Assim levo todos vocês no coração, sendo imensamente grata por terem passado pela minha vida e deixado boas lembranças. Muito obrigada!

Por fim, a FAPESQ que auxiliou financeiramente à pesquisa e a coordenação de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelos serviços prestados, para o desenvolvimento do discente no âmbito profissional.

## RESUMO

O gênero *Pseudomonas* abarca uma série de microrganismos que têm como forte características o oportunismo à infecção. A *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria pertencente ao grupo não difere nesse sentido, é um microrganismo patogênico com índices elevados de infecção, principalmente em ambientes hospitalares, além de estarem associadas a um nível elevado de morbidade e mortalidade. A partir de todas essas preocupações, que tangem os fatores de resistência da *P. aeruginosa* em relação aos tratamentos clínicos e a inibição de atividade do biofilme, pesquisadores buscam novas alternativas através de novos compostos ou associação elementos químicos capazes de potencializar produtos farmacêuticos com finalidade antibacteriana. Assim a presente pesquisa tem como principal objetivo realizar a avaliação da capacidade antimicrobiana da molécula 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona sobre linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de testes *in vitro*. Os protocolos de execução foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), Departamento de Biotecnologia (DB), Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba. Para a realização dos testes de bancada utilizou-se de linhagens de *P. aeruginosa*. A concentração mínima inibitória CIM teve como resultado  $10^{-17}$ M, das micro diluições seriada partindo de  $10^{-2}$  a  $10^{-17}$ M, sendo este último, a menor concentração nos poços com atividade bacteriostática. Vale ressaltar ainda, que o experimento foi realizado em triplicado (n=3) e análise das placas após 24 horas. O CBM corroborou com os resultados demonstrados na CIM e desta forma conclui-se por meio do desenvolvimento da presente pesquisa que a molécula sintetizada, o Dibenzo, apresentou resultados antimicrobianos significativos e promissores, com eficiência na atividade lítica, atuando na parede celular do patógeno.

**Palavras Chaves:** Bioativos sintéticos, atividade bactericida, compostos antipseudomonas.

## ABSTRACT

The genus *Pseudomonas* encompasses a series of microorganisms whose strong characteristic is their opportunism to infection. *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium belonging to this group, is a pathogenic microorganism with high infection rates, especially in hospital settings, as well as being associated with a high level of morbidity and mortality. Based on all these concerns about *P. aeruginosa* resistance factors in relation to clinical treatments and inhibition of biofilm activity, researchers are looking for new alternatives through new compounds or the association of chemical elements capable of enhancing pharmaceuticals for antibacterial purposes. The main objective of this research is to evaluate the antimicrobial capacity of the molecule 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocin-6,12-dione on *Pseudomonas aeruginosa* strains by in vitro assays. The protocols were developed at the Laboratory of Environmental Microbiology (LAMA), Department of Biotechnology (DB), Biotechnology Center (CBiotec), Federal University of Paraíba. *P. aeruginosa* ATCC-25873 was used for the bench tests. The minimum inhibitory concentration (MIC) was  $10^{-17}$ M, from serial micro dilutions from  $10^{-2}$  to  $10^{-17}$ M, the latter being the lowest concentration in the wells with bacteriostatic activity. It should also be noted that the experiment was performed in triplicate (n=3) and the plates were analyzed at 24 hours. The MBC corroborated the results shown in the MIC so it is concluded through the development of this research that the synthesized molecule, Dibenzo, showed significant and promising antimicrobial results, with efficient lytic activity, acting on the cell wall of the pathogen.

**Keywords:** Synthetic bioactives, bactericidal activity, antipseudomonal compounds.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Estrutura química da molécula.

**Figura 2-** 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona.

**Figura 3-** Análise da CIM Após 24h.

**Figura 4 –** Concentração bactericida mínima após 60 min na presença de rezasurina.

**Figura 5-** Nível De Significância Em Relação Ao Efeito Da Molécula Sobre A Linhagem Estudada.

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1** – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do 6,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona frente a linhagens de *P. aureginosa*.

**Tabela 2** – Valores de absorvância do dibenzo sobre linhagem de *P. aureginosa* ATCC 27853 na ausência (controle) e na presença da substância

**Tabela 3** – Valores da média  $\pm$  erro padrão da média do dibenzo sobre linhagem de *P. aureginosa* ATCC 27853 na ausência (controle) e na presença da substância.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AI-** Auto indutores

**ATCC-** American Type Culture Collection

**BHI-** Caldo Brain Heart Infusion

**CBM-** Concentração Bactericida Mínima

**CIM-** Concentração Inibitória Mínima

**DCM-** Diclorometano

**Dibenzo-** Macrociclo 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona

**DMSO-** Dimetilsulfóxido

**DNA-** Ácido desoxirribonucleico

**ESKAPE** -*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*

**Fe-** Ferro

**GTP-** Guanosina trifosfato

**H0 e H1=-** Hipótese a serem testada a nível de significância

**LPS-** Lipopolissacarídeo

**M-** Molar

**µL-** Microlitros

**Mg-** Miligrama

**MH-** Mueller-Hinton

**mL/mol-** Mililitro/molar

**nm-** Nanômetro

**NaCl-** Cloreto de sódio

**P-** Nível de significância

***P.aeruginosa***- *Pseudomonas aeruginosa*

**QS-** *quorum sensing*.

**RNAs-** Ácido Ribonucleico

**sRNAs-** Ácido Ribonucleico small

**SOCl<sub>2</sub>**- Cloreto de tionila

**≤**- Menor ou igual

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Pseudomonas aeruginosa.....	13
2.2 Fatores de Virulência.....	14
2.2.1 Formação de Biofilme.....	14
2.2.2 Motilidade.....	15
2.3 Macroциclos.....	17
2.4 Síntese da Molécula 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona.....	17
3 OBJETIVOS.....	19
3.2 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4 METODOLOGIA.....	20
4.2 Local da Pesquisa.....	20
4.3 Desenho Gráfico- Modelo Tridimensional.....	20
4.4 Meio de crescimento e linhagens microbianas.....	20
4.6 Concentração inibitória mínima (CIM).....	21
4.7 Concentração bactericida mínima (CBM).....	21
4.8 Investigação do mecanismo de ação através do D-sorbitol.....	22
4.9 Análise Estatística.....	23
5 RESULTADOS.....	23
5.1 Formulação do Macroциclos.....	23
5.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	25
5.3 Análise De Significância Do Potencial Microbiano Da Molécula 6H, 12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona.....	28
6 DISCUSSÃO.....	31
7 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pseudomonas* abarca uma série de microrganismos que têm como forte características o oportunismo à infecção. A *Pseudomona aeruginosa*, bactéria pertencente ao grupo não difere nesse sentido, é um microrganismo patogênico com índices elevados de infecção, principalmente em ambientes hospitalares, além de estarem associadas a um nível elevado de morbidade e mortalidade em grupos como os de indivíduos que apresentam complicações médicas respiratórias, por exemplo, doença pulmonar obstrutiva crônica, ou ainda, pneumonia em seu quadro de saúde (MARTÍN; MEJÍAS; MCCLEAN, 2021).

As infecções associadas a este patógeno podem ainda, se apresentar como agudas ou crônicas, com isso a *P. aeruginosa* é classificada como um dos principais agentes causadores de Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) compondo o grupo denominado ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*) (JUNIOR, et al. 2023). Essa classificação é proveniente da versatilidade biológica que esses microrganismos apresentam, em decorrência dos fatores de virulência a eles associados como a produção de biofilme, além de outros fatores determinantes de resistência à antibióticos abrigados em seu genoma, favorecendo uma maior plasticidade fenotípica quando submetido a estresse em múltiplas condições do ambiente, incluindo a resposta imune do próprio hospedeiro (RIQUELME; et al. 2020). Assim o grupamento ESKAPE é considerado como os mais resistentes a ação de antibióticos, sendo essa, umas das maiores preocupações destacadas pela comunidade científica.

À luz de Yan & Wu (2019) a formação de biofilme, um dos fatores de virulência associado, desempenha um importante papel no quesito resistência à medicamentos antibacterianos, todavia sua indução se dá por meio de vários processos dos quais pode-se destacar o *quorum sensing* (QS), diguanosina

monofosfato bis-(3'-5')-cíclico (c-di-GMP) e pequenos RNAs (sRNAs) como fatores relevantes associados a síntese e dispersão de biofilme.

SCOFFONE, *et al.* (2019) destaca que o sistema QS caracterizado em Las e Rhl como reguladores da expressão gênica utilizando o acil-homoserina lactona como auto indutores (AI) auxiliam no processo de motilidade do patógeno regulando positivamente a translocação rápida de uma população bacteriana, bem como o sistema PQS, que também faz uso de reguladores de expressão, sendo estes, o 2-alkuil-4-quinolonas como mecanismos de controle e regulação à aquisição de ferro (Fe) por meio de sideróforos (piochelina, pioverdina) para que estas populações adquiram elementos capazes de manter a sua proliferação e regulação por meio da formação de biofilme, como também manutenção à sua mobilidade.

O movimento de translocação rápida corrobora para uma dispersão eficiente de células da colônia bacteriana, dessa forma se faz uma etapa crucial e única para que este fator de virulência se espalhe de modo ágil e eficaz colonizando novas superfícies, como também para a transição de células dispersas do biofilme para a fase de crescimento planctônico (YAN, *et al.* 2019).

As *Pseudomonas aeruginosas*, são microrganismos patogênicos como já mencionado, de alta capacidade de resistência a antibióticos inibindo atividades metabólicas do fármaco, muitas vezes substancialmente, a partir dos seus mecanismos de defesa destacados. Pensando nisso, Bellotto, *et al.* (2022) ressalta que não apenas os fatores de virulência são responsáveis pela resistência ao tratamento com base em medicamentos antimicrobianos, que outros fatores, estes em decorrência do uso indevido ocasionado pelo próprio indivíduo resultam nesta ineficácia medicamentosa.

Muitas vezes pela interrupção abrupta quando há os primeiros sinais de melhora, o não cumprimento do ciclo de tratamento medicamentoso ou até mesmo rejeição ao fármaco por parte do sistema biológico do paciente, conferem fatores que auxiliam na manutenção, desenvolvimento e resistência do patógeno. Favorecendo o microrganismo, além de dificultar o tratamento clínico e a erradicação do mesmo em detrimento do paciente.

A partir de todas essas preocupações relacionados aos fatores de resistência da *Pseudomonas aeruginosa* sobre os tratamentos clínicos e a

inibição de atividade do biofilme, pesquisadores buscam novas alternativas através de novos compostos ou associação elementos químicos capazes de potencializar produtos farmacêuticos com finalidade antibacteriana para uso clínico, bem como alternativas que visem a redução do impacto que esse perfil bacteriano traz.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 *Pseudomonas aeruginosa***

A *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, altamente infecciosa, como já mencionado. Esse elevado índice de patogenicidade é decorrente dos fatores de virulência ligado intrinsecamente ao seu sistema morfofisiológico, regulado pelo *quorum sensing* (QS). O QS, por sua vez, é um mecanismo de comunicação que depende da produção e detecção de moléculas sinalizadoras, os AI's (SIMANEK, *et al.* 2023). Além disso, os fatores de virulência contribuem de modo significativo com a síntese de enzimas específicas, capazes de disseminar no organismo altos níveis de resistência, pois estão interligadas ao plasmídeo que se desenvolve de forma independente ao DNA cromossomial, bem como mecanismos extracelulares, tais como as bombas de efluxo e proteínas transmembranares que permitem o transporte de substâncias com alto peso molecular para fora da célula (Martín., *et al* 2021).

Sendo contemplado ainda, pela alta seletividade de membrana, do qual se apresenta com baixa permeabilidade, formada por um folheto externo que contém lipopolissacarídeos (LPS) estabilizados por cátions divalentes carregados positivamente, com capacidade ainda de receber ânions negativos a fim de promover a estabilidade eletroquímica do folheto de membrana, enquanto o folheto interno é composto por fosfolipídios típicos (Martín., *et al* 2021). Transformando-se assim em um mecanismo de barreira protetiva impedindo a entrada de moléculas no meio intracelular, dificultando com isso o acesso de alguns fármacos à chegada, bem como a entrega de uma quantidade molecular eficaz para ação antimicrobiana.

O microrganismo destacado pelo presente estudo apresenta ainda três circuitos de QS, sistematizado de forma hierárquica, segundo Simanek, *et al.* (2023) que correspondem a seguinte ordem: o sistema Las que regula a expressão do gene de virulência, constituído pela família de proteínas LuxI responsável pela degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e LasI, que sintetiza a acil homoserina lactona (AHL) N- (3-oxododecanoil) -L-homoserina lactona (3OC<sub>12</sub> HSL) e o receptor LasR do tipo LuxR, também famílias de proteínas . Quando ligado ao 3OC<sub>12</sub> HSL, o LasR dimeriza atuando como fator transcricional ativo regulador do sistema Rhl (KOSTYLEV, *et al.* 2019).

Já o sistema Rhl, podendo ser considerado um ativador transcricional, é composto por pares de auto indutores sintase/receptor RhlI/R. RhlI responsáveis pela síntese do produto N-butanoil-L-homoserina lactona (C<sub>4</sub> HSL), que se liga e ativa o receptor do fator de transcrição RhlR. RhlR é responsável pela regulação e expressão de vários fatores de virulência assim como LasR, mas também de genes envolvidos na biossíntese de fenazina e na produção de ramnolipídeos, uma classe de glicolipídios produzidos por *P. aeruginosa*. O terceiro sistema, comumente chamado de sistema quinolônico é regulado positivamente pelo LasR, porém reprimido pelo RhlR. Este sistema codifica enzimas responsáveis pela síntese da moléculas AI 2-heptil-3-hidroxi-4(1 H)-quinolona (PQS), que se liga ao receptor PqsR resultando em uma alça de feedback positivo, necessária para atividades catalíticas, desse modo o microrganismo apresenta a via de sinalização RhlI-RhlR-PqsE (KOSTYLEV, *et al.*, SIMANEK, *et al.* 2019; 2023).

## **2.2 Fatores de Virulência**

### **2.2.1 Formação de Biofilme**

A formação de biofilme é um fator de virulência que permite às células microbianas crescimento multicelular com características adaptativas as diferentes condições impostas pelo ambiente. A síntese é mediada pelo aumento do c-di-GMP cíclico, induzindo a produção de exopolissacarídeos responsável pelo processo de adesão a superfície, além disso essa molécula sinalizadora

contribui ainda para a adaptação da superfície e progressão do ciclo celular e virulência (JENAL., *et al* 2017). Na etapa final do ciclo de vida do biofilme, as células já maturadas, se dispersam de modo individual retomando um estilo de vida planctônico Rumbaugh & Sauer (2020).

Ainda de acordo com Rumbaugh & Sauer (2020) as bactérias apresentam duas formas distintas de crescimento, sendo elas, o modo planctônico de vida livre ou sésil. No modo planctônico os microrganismos formam colônias ou realizam um processo de transição vivendo associado à superfície. O que caracteriza o modo sésil é o silenciamento do gene que expressa o fenótipo do flagelo, a síntese de componentes importantes da matriz do biofilme, além da indução de bombas de efluxo que tem como objetivo gerar mecanismos de resistência à antibióticos aumentando o nível de virulência.

Segundo o estudo de CAI, *et al.* (2020) a formação e o modo de dispersão do biofilme de *P. aeruginosa* está relacionado com os níveis de concentrações do GMP dimérico cíclico (c-di-GMP). No qual duas atividades enzimáticas demonstram funções distintas, sendo elas responsáveis uma pela produção e outra pela degradação do c-di-GMP. A atividade enzimática exercida pelo diguanilato ciclases (DGCs) sintetizam c-di-GMP a partir de duas moléculas de trifosfato de guanosina (GTP), enquanto as fosfodiesterases (PDEs) hidrolisam o mensageiro secundário em pGpG. A transição entre os modos de vida da *P.aeruginosa* é acompanhada pela produção de exopolissacarídeos e alterações na motilidade.

### **2.2.2 Motilidade**

Os principais tipos de motilidade em *P. aeruginosa* são natação mediada por flagelos monotríquios, quando trata-se de movimento executado por um único flagelo, ou peritríquias quando for multiflagelar Norte, *et al.* (2022). E espasmos mediados por pili, este podendo também ser denominados de fimbrias, que por sua vez, apresentam tipagens diferentes para os processos metabólicos do microrganismo. O pili nada mais é do que filamentos de cadeias

proteicas que se projetam da célula, capazes de reconhecerem receptores específicos de células eucarióticas em região de superfície CAI, et al. (2020).

O deslocamento envolvendo grupos multicelulares, se dá por enxameação fazendo-se necessário para a bactéria. Esta dispersão compreende no movimento coordenado das células bacterianas que se movimentam através da rotação dos flagelos por regiões citosólicas, englobando a natação por pili e surfactantes. A motilidade desses grandes grupos de células ocorre rapidamente sobre a superfície, quando combinada com o crescimento celular, leva à rápida expansão externa da colônia, favorecendo assim uma colonização e aumento do nível de infecção no organismo hospedeiro, dificultando o processo de tratamento clínico antibacteriano Wadhwa & Berg (2021).

Contudo a motilidade por espasmos mediada por pili, de acordo com Wadhwa & Berg (2021) são as mais difundidas entre as gram-negativas, a maior parte apresenta múltiplos pili que sofrem ciclos independentes de extensão e retração, esses filamentos podem apresentar projeções em regiões diferente, a depender da forma do microrganismo, no caso da *P. aeruginosa* concentra-se nos polos. Algumas de suas várias funcionalidade é mediar processos relacionados à adesão do hospedeiro, virulência e detecção de superfície.

Como é possível perceber há uma grande diversidade em relação ao modo de deslocamento e dispersão dos microrganismos, sendo a motilidade um fator de virulência que tem características específicas, como por exemplo a quantidade e posicionamento dos flagelos, além do padrão de motilidade. Tamanha variância está pautada na ocupação pelas bactérias à diferentes nichos ecológicos, garantindo vantagens adaptativas para sobrevivência da espécie no meio. Por isso se faz necessário estudos cada vez mais aprofundado sobre a relação intrínseca de patógeno e hospedeiro, bem como a relevantes diferenciações fisiológicas que estes apresentam como mecanismos de defesa.

### 2.3 Macrociclos

Os macrociclos são considerados moléculas orgânicas, formadas por um anel contendo pelo menos 12 átomos pesados, o que lhes confere diversidade funcional e complexidade estereoquímica em uma estrutura semirrígida, além pré-organizada (Kihberg., *et al* 2023). Assim são considerados como grandes potenciais para a síntese de drogas, uma vez que, seus átomos pesados conferem estabilidade à molécula e sua complexidade estereoquímica favorece a especificidade do composto, a partir da disposição espacial que pode ser modificada estruturalmente. Com isso é possível a inserção de elementos na cadeia sem desencadear instabilidade ou prejuízo à sua conformação estrutural.

Para esta pesquisa a molécula utilizada foi 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona observado na Figura 1. Essa substância tem como base o ácido salicílico uma substância, que de acordo com MISHRA., BAEK. (2021) é considerado um importante fitormônio, capaz de regular respostas de defesa contra patógenos impactando de modo direto ou indireto os fatores de virulência a estes associados.

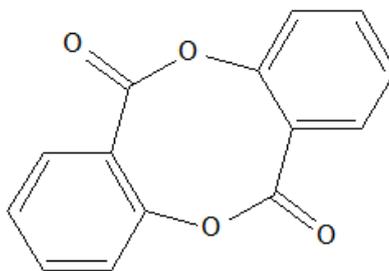
### 2.4 Síntese da Molécula 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona

A síntese do composto 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona foi realizada e concedida pelo Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade Federal da Paraíba- Campus I, João Pessoa-PB, coordenado pelo Professor. Dr. Luis Cezar Rodrigues. A produção se deu através da metodologia desenvolvida por Ferreira, M (2022) onde fez-se uso de 700 mg (Miligrama) do composto ácido salicílico, sendo adicionados à dissolução diclorometano (12 mL/mol), cloreto de tionila (1,8 mol, 1,2 eq.) e duas gotas de Dimetilformamida. Agitando-as pelo período de 24 horas em temperatura ambiente.

Em seguida a preparação sofreu processo de evaporação, tendo como finalidade a remoção do DCM e  $\text{SOCl}_2$  em excesso. Para a etapa seguinte, o trimetilamina (1,8 mmol, 1,2 eq.) foi dissolvido e logo após a solução de cloreto de ácido salicílico (1,0 eq., obtido da etapa a) foi adicionado gota a gota à reação resfriada. Após a adição final, a suspensão foi refluxada durante a noite até que

o material de partida fosse completamente consumido (monitorado por TLC). A mistura foi extraída com acetato de etila, diclorometano e metanol, os dois últimos formaram um precipitado, então as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com ácido clorídrico diluído e solução de salmoura, secas sobre sulfato de sódio anidro e concentradas em vácuo para obter um precipitado bege solúvel em DMSO.

**Figura 1** – Estrutura química da molécula.



**6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocine-6,12-dione**

**Fonte:** Ferreira, (2022).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.2 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade antimicrobiana da molécula 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona sobre linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM), bem como concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos em relação às cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Verificar o nível de toxicidade preliminar bactericida da molécula 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona.
- Avaliar a ação do 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona sobre a parede celular da *Pseudomonas aeruginosa* através dos níveis de absorvância.

## 4 METODOLOGIA

### 4.2 Local da Pesquisa

A pesquisa e os protocolos de execução foram desenvolvidos no Laboratório de Farmacobiotecnologia (FARMABIO), Departamento de Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba. As linhagens dos microorganismos, obedeceram a padrão ATCC, como também cepa selvagem de *Pseudomonas aeruginosa*, pertencente à biblioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), coordenado pelo Prof. Ulrich Vasconcelos.

### 4.3 Desenho Gráfico- Modelo Tridimensional

Para o desenho tridimensional das molécula 6H, 12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona foi utilizado o programa computacional *ChemSketch*. Modelagem molecular a partir da fórmula química dos compostos.

### 4.4 Meio de crescimento e linhagens microbianas

Para a produção do meio de cultura, fez-se uso de materiais não seletivos a fim de favorecer o crescimento do microrganismo, para a preparação do meio sólido foram utilizados ágar Mueller-Hinton (MH) 11,4 g, água destilada 300ml, e caldo Brain Heart Infusion (BHI) todos adicionados em um erlenmeyer e levados ao micro-ondas para ser dissolvido por completo.

Posteriormente adicionados em placas de petris estéreis, após alguns minutos de descanso em temperatura ambiente prossegui-o com a técnica de repicagem e em seguida as placas foram levadas à estufa em temperatura  $35 \pm$  °C para crescimento das células bacterianas, estas provenientes de *P. aeruginosas*, linhagens TGC 04, ATCC-27853 e ATCC 9027 pertencentes à coleção de culturas do LAMA. Para a preparação do inóculo a cultura foi

suspensa em solução estéril de cloreto de sódio (NaCl) finalizando o processo de homogeneização com auxílio de um agitador.

#### **4.6 Concentração inibitória mínima (CIM)**

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) das moléculas sobre as linhagens, foi realizado por meio da técnica de microdiluição em triplicata, utilizando-se de microplacas contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®). Inicialmente distribuídos 200 µL de MH nos poços das placas. Em seguida, foi feita uma diluição seriada a uma razão de dez, de forma que as concentrações finais das substâncias nos poços após a adição do inóculo foi de  $10^{-2}$  até  $10^{-17}$  M. Por fim, foi adicionado 20 µL do inóculo das linhagens testadas, onde cada linha da placa refere-se a um grupamento ATCC específico. As placas assepticamente fechadas foram incubadas a  $35 \pm 0^{\circ}\text{C}$  pelo período 24h a leitura do CIM foi realizada posteriormente FLAMM *et al.*, (2017).

A CIM foi definida como a menor concentração dos produtos capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento bacteriano nos poços, quando em comparação com seu controle. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios menores que  $10^{-17}$  M ARENDRUP *et al.*, (2017).

#### **4.7 Concentração bactericida mínima (CBM)**

Posteriormente à análise do CIM, seguiu-se com a técnica de Concentração Mínima Bactericida (CBM), ao qual as placas foram retiradas da estufa mantendo-as em temperatura ambiente. O corante Resazurina (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one), diluído em água destilada para obter concentração à 1%, foi depositado sob as triplicatas com auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo assim possível, a verificação do crescimento bacteriano ou inibição nos poços. Comparando-o com o protocolo CIM já executado e analisado anteriormente, mensurando assim a efetividade das moléculas em

inibir o crescimento dos microrganismos testados SUSHIMITHA, et al (2023); APUD: REPP, et al (2007).

#### 4.8 Investigação do mecanismo de ação através do D-sorbitol

Para esta análise foi preparado inicialmente as suspensões bacterianas, a partir da linhagem padrão ATCC-27853, em solução salina (NaCl a 9%) de acordo com o nível um de turbidez padrão da escala Mcfarland. Em seguida deu-se a diluição do D-sorbitol na concentração de 10 mL (1,45736 g/mol), previamente adicionados ao caldo nutriente (225 µL) e agitado manualmente para dissolução completa.

Para a inoculação da linhagem, realizada também em triplicata, as quantidades depositadas na placa de 96 poços foram, 90 µL de D-sorbitol diluído em caldo nutriente, 10 µL de suspensão bacteriana e 10 µL da molécula diluída em água destilada nas concentrações seriadas em  $10^{-4}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-17}$  M. Por fim foram separados três poços nas placas para o controle de esterilidade, contendo 90 µL de D-Sorbitol diluído em caldo nutriente, bem como três poços para controle de viabilidade contendo 90 µL de D-Sorbitol diluído em caldo nutriente e 10 µL de suspensão bacteriana FARIAS, B (2023).

Após a preparação da placa, esta seguiu para a estufa permanecendo por 24 horas na estufa em temperatura de  $35 \pm ^\circ\text{C}$ , passado esse período foi realizada a leitura de densidade óptica no comprimento de onda de 630 nm. Este comprimento de onda foi estabelecido, a partir dos critérios de absorção de luz da parede celular do microrganismo, uma vez que *P.aeruginosa* apresenta em sua parede uma camada protetiva de resistência, de tal modo que, quanto maior do a incidência de luz (630 nm), maior será a absorção, facilitando a análise de dados obtidos pelo espectrofotômetro do mecanismo de ação através do D-sorbitol.

Os dados foram plotados como média  $\pm$  erro padrão da média, onde os valores de *p* foram considerados significantes quando menores que 0,05.

## 4.9 Análise Estatística

Para a análise estatística realizou-se a descrição dos dados no programa computacional Excel 2023. Neste programa foram tabulados os valores obtidos a partir da CIM, reconhecendo o menor volume da molécula no poço, este que foi dirigido em um n amostral de três. A partir disso foi calculado a média de resultados positivos em relação a atividade antimicrobiana de cada poço, levando em consideração que a micro diluição é decorrente da unidade em molar.

Seguido do “teste t” para averiguação do nível de confiança que esses dados exprimem, ao qual o  $P \leq 0,05$ . Estabelecendo assim nível de significância trazendo confiabilidade aos dados testados Neto, P (2006).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Formulação do Macrociclo

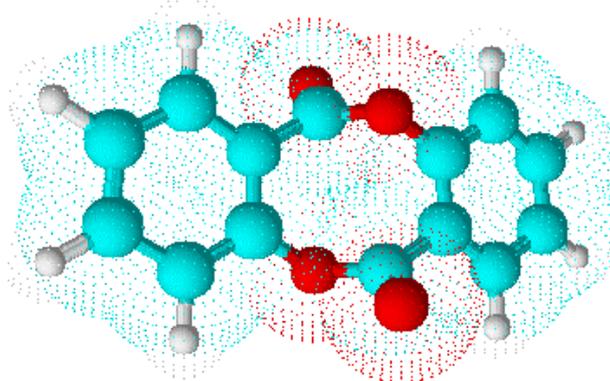
Para esta pesquisa como já mencionado, foi utilizado a molécula 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona dando prosseguimento aos testes antimicrobiano. Essa substância tem como base o ácido salicílico um componente, que de acordo com MISHRA., BAEK. (2021) é considerado um importante fitormônio, capaz de regular respostas de defesa contra patógenos. Além disso o ácido é também um  $\beta$ -hidroxicarboxílico e esta característica lhe confere propriedades antimicrobianas.

Dessa forma a síntese da molécula (Figura 2) com seus átomos pesados favorecem estabilidade à molécula e entrega de maiores resultados em relação as suas propriedades, bem como sua capacidade estereoquímica capaz de trazer especificidade ao composto, a partir da disposição espacial que pode ser modificada estruturalmente. Com isso é possível a inserção de elementos na cadeia sem acarretar instabilidade ou prejuízo à sua conformação estrutural e aos componentes originários.

O arranjo deste composto permite por exemplo que a capacidade antimicrobiana do ácido salicílico atue em conjunto com o  $\text{SOCl}_2$  muito utilizados

na síntese de outros fármacos, sem alterar a composição química de ambos e ainda sim, atuarem com o mesmo objetivo. Vale salientar que de acordo com HANNACH. et al (2019) o ácido salicílico desenvolve um importante papel na regulação gênica de fatores de virulência causando super-expressão de genes dependentes do fator sigma B. Isto é, repressão de genes reguladores, por conseguinte Ihe é expresso em lócus a toxina  $\alpha$  (hla) dependente do ácido, bem como a expressão genômica das adesinas ligadas à parede celular, levando à atenuação da proliferação bacteriana e aumentando a produção de exoenzima e proteínas. Desse modo é possível compreender os fatores associados ao macrociclo que desencadeiam ações inibitórias de atividade celular bacteriana.

**Figura 2 - 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona**



**Fonte:** Autora, (2024).

A partir da figura acima é possível identificar que as conformações estruturais dos anéis se assemelham, oriundas da base do ácido salicílico. Em azul observa-se os anéis de benzeno composto por suas cadeias de Carbono (C) e Hidrogênio (H); em vermelho têm-se as ligações com o Oxigênio (O), por fim as unidades em branco são os quirais de dupla ligação de carbono. A estereoquímica do elemento representado acima, assim como suas unidades quirais permitem que haja edição nas unidades formadoras do composto

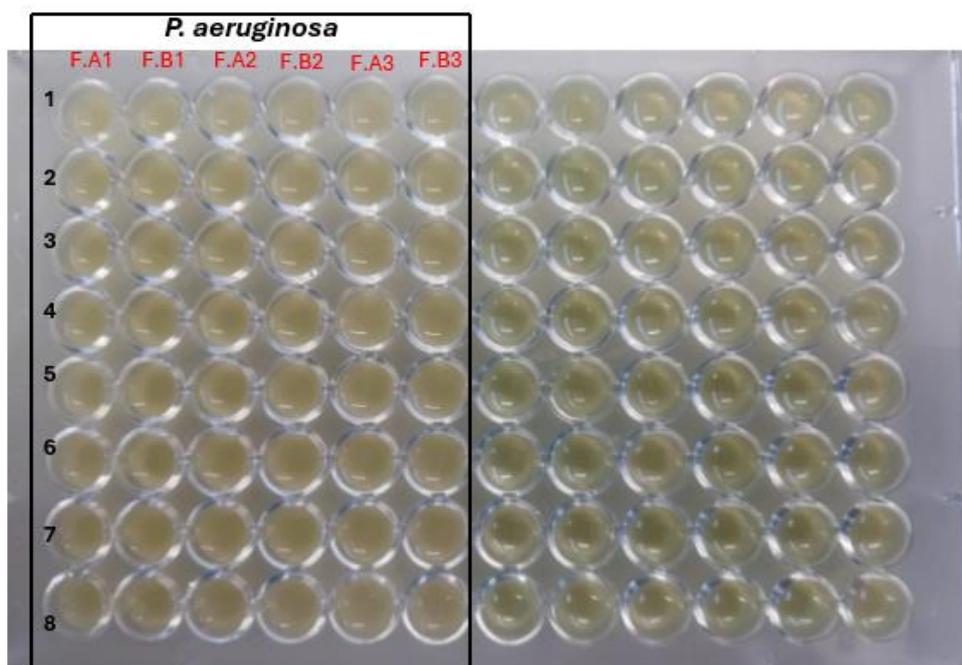
sintetizado, mantendo o 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona a capacidade de conservar suas propriedades orgânicas, mas a facilitação de manipulação deste para melhoramento ou novas sínteses mantendo a sua base estrutural.

## **5.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A concentração mínima inibitória das moléculas se deu através da micro diluição seriada partindo de  $10^{-2}$  a  $10^{-17}$  M, sendo este último, a menor concentração micro diluída nos poços que apresentou atividade bacteriostática, ou seja, a ação da substância cessou o crescimento celular bacteriano, como demonstrado nos dados da Tabela 1. Vale ressaltar ainda, que o experimento foi realizado em triplicata (n=3) como pode ser observado na Figura 3. A análise das placas após 24 horas foi observacional, através do padrão de turbidez presentes nos poços. Os níveis de turbidez analisados nos poços 1-8, de ambas as triplicatas indicaram atividade bacteriostática da molécula, constatando assim inibição de crescimento das células bacterianas nos poços indicados na figura abaixo pela molécula e6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona.

Considera-se efeito inibitório de crescimento, ou atividade bacteriostática, quando no poço contendo a substância, juntamente com células microbianas e meio de crescimento estiver translúcido ou pouco turvo, sendo confirmado à ação da substância pelo CBM, realizado posteriormente a análise observacional do CIM Farias (2023). A partir dessa compreensão é possível afirmar a potência antimicrobiana do composto sintetizado.

**Figura 3-** Análise da CIM após 24 h



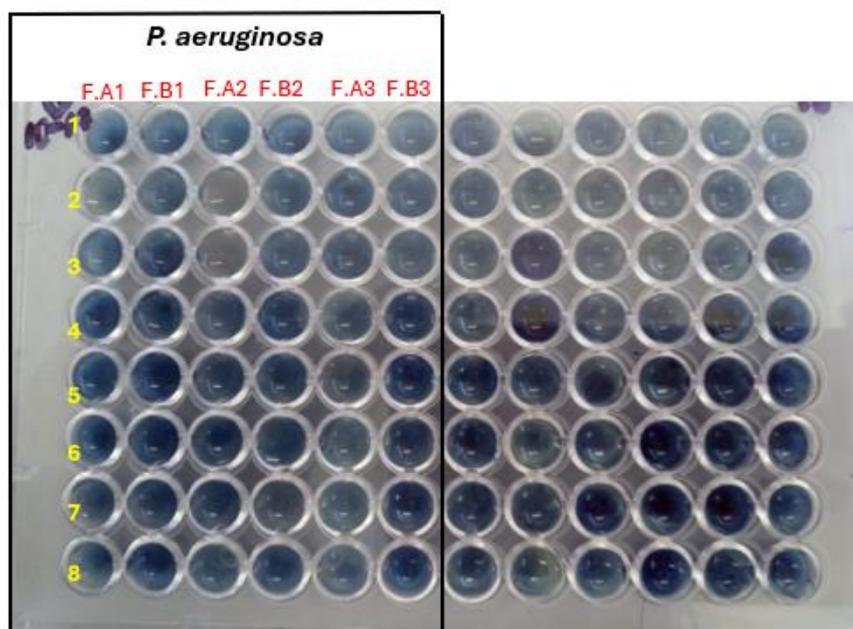
**Legenda:** Números de 1-8 direção da leitura dos poços. FA1, FA2, FA3: diluições seriadas do 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona de  $10^{-2}$  a  $10^{-9}$  M, assim como em FB1, FB2 3 FB de  $10^{-10}$  a  $10^{-17}$  M.

**Fonte:** Autora, (2024).

Assim, para que fosse possível atestar a viabilidade microbiana o corante resazurina diluído até a concentração de 1% foi inserido nos poços, como pode ser observado na Figura 4, após o período de 60 minutos os poços se mantiveram corados em azul, cor característica do corante. Corroborando, a partir deste dado, com os resultados da CIM que exprimem alto potencial antimicrobiano da substância inibindo o crescimento da cepa estudada.

É necessário destacar que este método de análise da viabilidade celular, indica que não há atividade metabólica ativa nos poços, uma vez que, se houvesse atividade metabólica os poços se encontrariam em tonalidade rosa, cor característica da redução de resazurina em resofurina pela atividade metabólica celular microbiana

**Figura 4 –** Concentração bactericida mínima após 60 min na presença de resazurina



**Legenda:** Números de 1-8 direção da leitura dos poços. FA1, FA2, FA3: diluições seriadas do 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona de  $10^{-2}$  a  $10^{-9}$  M, assim como em FB1, FB2 3 FB de  $10^{-10}$  a  $10^{-17}$  M.

**Fonte:** Autora, (2024).

**Tabela 1** – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona frente a linhagens de *P. aureginosa*

<i>P.aureginosa</i>	[6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona] M			CE	CV	CS
	CIM	CBM	CBM/CIM			
<b>ATCC 27853</b>	$10^{-17}$	$10^{-17}$	1 (Bactericida)	-	+	+
<b>ATCC 9027</b>	$10^{-17}$	$10^{-17}$	1 (Bactericida)	-	+	+
<b>TGC 04</b>	$10^{-17}$	$10^{-17}$	1 (Bactericida)	-	+	+

**Legenda:** CE = controle de esterilidade; CV = controle de viabilidade; CS = controle solvente; ( - ) = ausência de crescimento; ( + ) = presença de crescimento. CBM/CIM: valores maiores 4 (bacteriostático), valores menores ou iguais a 4 (bactericida).

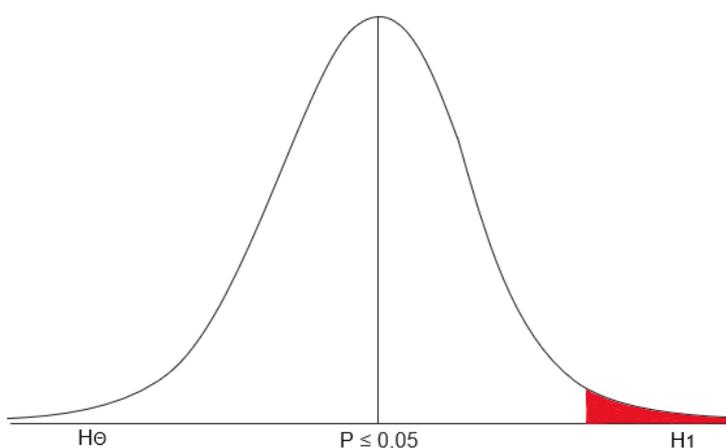
### 5.3 Análise De Significância Do Potencial Microbiano Da Molécula

Para a construção analítica desses dados, foram coletados os dados obtidos, a partir da CIM corroborado pelos resultados expressos no CBM. E assim obteve-se a média de valores das concentrações dos poços das placas que tiveram resultados considerados significativos. Como descrito na Tabela 1, todos os poços apresentaram atividade bactericida, tendo em vista que os valores calculados de CBM sobre CIM foram  $\leq 4$  como descritos na pesquisa de Siddiqui, et al. & Flamm, et al (2013; 2017). Logo, a média de todas as concentrações  $10^{-2}$  a  $10^{-17}$  M, foram extraídas para então ser verificado o nível de significância, devendo este apresentar  $P \leq 0,05$  e assim testar as hipóteses relacionadas abaixo (MAGALHÃES & LIMA; 2002).

$H_1$ = O microrganismo apresenta susceptibilidade à molécula.

$H_0$ = O microrganismo não apresenta susceptibilidade à molécula.

**Figura 5-** Nível de significância em relação ao efeito da molécula sobre a linhagem estudada



**Fonte:** Autora, (2024).

Com os valores alcançados pela média dos resultados da micro diluição, esta equivalente a  $M^0=1$ , menos o percentual possível de desvio padrão desta média, obteve-se um nível de significância de 0,01 inferior à  $P$  amostral de significância equivalente a 0,05. A partir disto é possível assumir que o 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona apresentou nas testagens *in vitro* um nível elevado de potencial antimicrobiano, tendo em vista as concentrações que foram testada em triplicata frente a linhagens de *P.aeruginosa* ATCC e selvagem.

De tal modo que, de acordo com as hipóteses testadas  $H1=$  O microrganismo apresenta susceptibilidade à molécula e  $H0=$  O microrganismo não apresenta susceptibilidade à molécula, aceita-se os seguintes termos para as hipóteses testadas. Com valor de confiança estabelecido como demonstrado no gráfico acima, aceita-se  $H1$ , tendo em vista seu percentual significativo e rejeita-se  $H0$  como hipóteses testadas e tabuladas a partir dos valores obtidos dos testes de bancada, ao qual molécula exprimiu efeito inibitório da atividade celular microbiana de *P.aeruginosa*.

#### **5.4 Investigação do mecanismo de ação da molécula 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona frente a *P. aureginosa* na presença do D-sorbitol**

Para o teste do D-sorbitol foi escolhida a linhagem padrão ATCC. Na tabela 2 estão registrados os valores originais do padrão de densidade óptica do 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona na presença na presença do D-sorbitol. Como podemos observar na tabela 2, os valores da média  $\pm$  erro padrão da média da densidade óptica na ausência (controle) e na presença ( $10^{-4}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-17}$  M) do macrociclo não apresentaram diferença estatística significativa entre si. Diante desses resultados podemos sugerir que o mecanismo de ação da

substância se dá pela parede celular do microorganismo. Não podemos descartar outras vias envolvidas que ainda não foram testadas.

Por se tratar de uma molécula inédita, esse é o primeiro estudo que demonstra tal mecanismo, não havendo nenhuma pesquisa sobre o efeito do macrociclo sobre a parede celular do gênero *Pseudomonas*.

Entretanto Cobian, *et al* (2022) relata que A parede celular bacteriana é um polímero filamentosos de glicano reticulados com dissacarídeo de ácido  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N - acetilglucosamina (NAG)-N - acetilmurâmico (NAM) repetido, quando associado a sacarídeos o polímero da parede celular envolve a membrana citoplasmática e fornece integridade estrutural à bactéria. Várias enzimas atuam na biossíntese, renovação e homeostase geral da parede celular. São justamente estas enzimas que as substâncias biologicamente ativas apresentam mecanismo de ação, promovendo desregulação no meio desencadeando lise celular. Na da Tabela 2-3 destaca-se os valores inferidos da atividade promovida pela molécula quando em contato com a ATCC 27853, bem como na presença e ausência de sorbitol. Sendo analisados os valores de absorvância, como também o desvio padrão da molécula testada.

A partir dos dados descritos abaixo, verifica-se que a CIM do composto testado aumentou significativamente com a adição do sorbitol para a cepa testada. No qual os valores inferidos da absorvância resultaram em menor valor 1,068 e maior valor 1, 167 do controle (ausência de sorbitol), quando comparados com a menor concentração da molécula 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona a  $10^{-17}$  na presença do sorbitol infere-se 1,197 e 0,892 como maior e menor valore respectivamente. Ademais as concentrações de  $10^{-4}$  e  $10^{-8}$  demonstraram resultados semelhantes ao CIM na presença de sorbitol, com mecanismo de ação ascendente, em relação ao controle.

**Tabela 2** – Valores de absorvância do 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona sobre linhagem de *P. aureginosa* ATCC 27853 na ausência (controle) e na presença da substância

<b>[dibenzo] M</b>	<b>Absorvância (nm)</b>		
<b>controle</b>	1,068	1,159	1,167

<b>10<sup>-4</sup></b>	1,147	1,210	1,135
<b>10<sup>-8</sup></b>	1,173	1,121	1,199
<b>10<sup>-17</sup></b>	1,197	1,182	0,892

**Tabela 3** – Valores da média ± erro padrão da média do 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona sobre linhagem de *P. aeruginosa* ATCC 27853 na ausência (controle) e na presença da substância

<b>[dibenzo] M</b>	<b>Absorbância (nm)</b>
<b>controle</b>	1,131 ± 0,078
<b>10<sup>-4</sup></b>	1,164 ± 0,067
<b>10<sup>-8</sup></b>	1,164 ± 0,067
<b>10<sup>-17</sup></b>	1,145 ± 0,057

**Legenda:** Valores de  $p > 0,05$  (controle vs, concentrações)

Para tanto a média do desvio padrão Tabela 3 corrobora para consideração de um aumento pronunciado da CIM na presença do sorbitol, sugerindo desta forma atividade lítica sobre a parede celular da linhagem ATCC 27853 testada. Pode-se destacar ainda que a atividade do macrociclo induz a lise celular promovendo assim atividade bactericida, partindo da premissa que este componente altere o ciclo enzimático do patógeno.

## 6 DISCUSSÃO

A partir dos dados coletados nos testes de bancada, *in vitro*, análise e processamento destes, é possível assumir que o composto sintetizado 6H,12H-Dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona apresenta como uma de suas propriedades a atividade antimicrobiana, que por sua vez, destacou níveis significativos de eficiência no controle de crescimento celular bacteriano, neste caso um efeito positivo sobre as linhagens estudada de *P. aeruginosa*. Resultado de extrema importância, levando em consideração o fator de

resistência que este microrganismo apresenta em relação às moléculas que tenham finalidade antimicrobiana.

O patógeno estudado é uma gram-negativa de baixa susceptibilidade a antimicrobianos, pois possuem fatores de virulência que se adequam à disponibilidade do ambiente de modo ágil. Seus fatores genômicos induzem mecanismo de respostas eficiente a todo mecanismo não reconhecido pelo patógeno, seja ele um mecanismo de defesa do hospedeiro, seja ele de intrusão de um composto medicamentoso. Por isso a importância de reconhecer essas características de defesa e trabalhar substância que possam vir a romper esses mecanismos de barreira impostos pelo patógeno em questão.

Dessa forma esta pesquisa, assim como outros estudos são necessários para sanar a problemática de super-resistência das bactérias de acrônimo ESKAPE, pois à medida que são expostas a drogas, suas células desenvolvem novos mecanismo de barreira ganhando resistência, possibilitando a estes microrganismos maior viabilidade no meio. Com isso indispensável o melhoramento de drogas já disponíveis para o uso clínico, bem como novas sínteses que tenham eficiência e objetividade ao alcançar o alvo no organismo hospedeiro, declinando a atividade bacteriana.

Corroborando com estes aspectos a pesquisa de HANNACH. et al (2019), também objetivada por compreender a eficiência do ácido salicílico, a base da substância sintetizada para este estudo, destaca que o ácido modula a expressão gênica de diversos fatores de virulência do patógeno Gram-negativo como  $\alpha$ -toxina, adesinas e síntese de biofilme. Seus resultados demonstraram que a toxina  $\alpha$  codificada pelo gene *hla*, apresenta alteração, tornando-se depende da composição molecular do ácido para expressão de adesinas ligadas à parede do microrganismo havendo atenuação de proliferação bacteriana em decorrência deste mecanismo de controle.

HANNACH. et al (2019), destaca ainda que embora a toxina  $\alpha$  esteja associada à ação lítica e à indução da agregação plaquetária, esta atenuação está sumariamente interligada à liberação de proteínas antimicrobianas plaquetárias. Por consequência há uma diminuição na virulência, a partir da indução da liberação de proteína plaquetária, decorrente da modulação

genômica expressa pela hla controlada pelos compostos presente no ácido. Destaca-se ainda que a adesina pertencente ao grupo de proteínas é expressa principalmente durante os estágios iniciais da infecção Mestres *et al* (2022). Logo o controle de sua expressão favorece a não perpetuação do quadro infecciosos diminuindo a aderência dessas células patogênicas a parede celular do hospedeiro.

O dibenzo por sua vez destaca-se por apresentar mecanismo de ação na parede celular do microrganismo, o mecanismo de ação com efeito lítico, promovendo a lise total ou parcial da parede celular do patógeno cessando sua proliferação. De acordo com Kawai *et al* (2023) um antimicrobiano com metabolismo central do carbono, apresenta atividade lítica promovendo a perda da integridade da parede celular atenuando os fatores de virulência deixando-a mais susceptível a ataques, no caso do macrociclo sua atividade cessou o crescimento celular.

A estereoquímica dos compostos antimicrobianos de modo geral, pode ainda, contribuir para a morte celular desses microrganismos através de danos oxidativos, por meio das cadeias de carbono. As mudanças metabólicas acontecem por via de oxidação de carbono e requerem o recrutamento de ATP, proporcionando um ambiente redox celular desregulado, dessa forma garante a letalidade dos antibióticos ativos na parede celular. Os resultados da pesquisa de Kawai *et al* (2023) destacam que a desregulação do metabolismo pela oxidação desencadeia consequências tóxicas das vias metabólicas a jusante que contribuem diretamente para a morte celular bacteriana.

A promoção de um ambiente tóxico por meio dos danos oxidativos resultantes das cadeias de carbono, reduzem na baixa captação de ferro pelos sideróforos, estes que por sua vez, são metabólitos quelantes deste elemento, ademais eles sintetizados e secretados pelo patógeno para solubilizá-lo e dessa forma regular através desta solubilização o seu metabolismo.

Entretanto quando há escassez desses metabólitos necessários manutenção e sobrevivência celular no meio é desencadeado uma perturbação metabólica que restringe a biodisponibilidade de ferro resulta em lise osmótica devido à formação de lesões na parede celular (CAVALCANTE., *et al* 2022). Segundo Kawai *et al* (2023) as reações descritas acima apresentam como

consequências diretas das perturbações metabólicas a inibição da parede celular à morte celular bacteriana, bem como conexões críticas entre a homeostase do ferro e aspectos específicos da atividade de morte.

A partir destas análises, compreendemos o efeito lítico que o dibenzo desencadeou em sua atividade antimicrobiana na parede celular da *P.aeruginosa*, obtendo-se desta forma resultados positivos e promissores para dar-se-á continuidade ao estudo de seu efeito, tendo como foco a produção de uma substância eficaz ao combate de uma bactéria com alto nível de resistência, bem como desenvolver a especificidade da mesma identificando os principais pontos fortes de suas propriedades ao ataque contra o patógeno.

## **7 CONCLUSÃO**

Desse modo, conclui-se por meio do desenvolvimento da presente pesquisa que o molécula 6H,12H-dibenzo[b,f][1,5]dioxocina-6,12-diona, apresentou resultados antimicrobianos significativos e promissores, com eficiência na atividade lítica, atuando na parede celular do patógeno ao qual foi submetido, à ATCC 27853. Sendo assim passivo à continuidade de estudos mais detalhados e novos testes de especificidade para a construção de uma droga capaz de auxiliar no combate a super resistência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* atenuando seu desenvolvimento metabólico, como também auxiliar nos tratamentos clínicos decorrentes de infecções por parte deste patógeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLOTTO, O., SEMERARO, S., BANDIERA, A., TRAMER, F., PAVAN, N., MARCHESAN, S. Polymer conjugates of antimicrobial peptides (amps) with d-amino acids (d-aa): State of the art and future opportunities. **Rev Pharmaceutics**. Fev, 2022.

CAI, Y., HUTCHIN, A., CRADDOCK, J., WALSH, M., WEBB, M., TEUS, I. Differential impact on motility and biofilm dispersal of closely related phosphodiesterases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Scientific Reports**. Abr, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63008-5>.

CAVALCANTE, F., CHAVES, V., SILVA, A., MARTINS, C., MARTINS, C. **ACTINOBACTÉRIAS BENÉFICAS DO SOLO: POTENCIALIDADES DE USO COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Jandaia-Go, V.19 N.40; P. 15. Jun, 2022. [https://doi.org/10.18677/Encibio\\_2022b2](https://doi.org/10.18677/Encibio_2022b2).

COBIAN, LF, DE BENEDETTI, S., KIM, C. In vitro studies of the protein interaction network of the cell wall lytic transglycosylase RlpA from *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Communications Biology**. Nov, 2022. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04230-x>.

FLAMM, RK., FARRELL, DJ., RHOMBERG, PR., SCANGARELLA-OMÃNE, SADER, HS. Gepotidacina (GSK2140944) In vitro activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Rev. Agentes Antimicrobianos Quimioterapia**. Mar, 2017. <https://doi.org/10.1128/aac.00468-17>.

HANNACHI, N., HABIB; CAMOIN-JAU, L. Effect of aspirin on *Staphylococcus aureus* - platelet interactions during infective endocarditis. **Rev. Fronteiras na Medicina**. Out, 2019. Doi <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00217>.

JUNIOR, A., MORONI, J., SOUZA, J., BUSARELLO, T., OLIVEIRA, C., GIANCURSI, T., MOREIRA, J., ERKMANN, V., SILVA, V., ORLANDO, B., SILVA, A. Infections By Bacteria Of The “ESKAPE” Group In Patients Admitted To An Intensive Care Unit Due To COVID-19. **Rev. The Brazilian Journal of Infectious Diseases**., vol 7. Out, 2023.

KIHLBERG, J., POONGAVANAM, V., JIMÉNEZ, D. Macrocycles in Drug Discovery - Learning from the Past for the Future. **Rev. Medicinal Chemistry**, Abr. de 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00134>.

KOSTYLEV, M., KIM, D., SMALLEY, N., DANDEKAR, A. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum detection hierarchy. **Rev. PNAS**. Abr de 2019. Doi: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1819796116>.

MAGALHÃES, M. N.; LIMA, A. C. P. Noções de Probabilidade e Estatística. 4. ed. São Paulo: EDUSP, 2002.

MASTERS, A., RICCIARDI, F., BENTLEY, M. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. **Rev. Nature Microbiology**. **Fev, 2022**. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00686-0>.

MARTÍN, J., MEJÍAS, S., MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **Rev. International Journal Molecular Sciences**. Mar, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>.

MISHRA, AK; BAEK, K.-H. Biosynthesis and Metabolism of Salicylic Acid: A Divergent Pathway for Plants and Bacteria. **Rev. Biomoléculas, Mai, 2021**. <https://doi.org/10.3390/biom11050705>.

PATEL, H., BUCHAD, H. & GAJJAR, D. *Pseudomonas aeruginosa* persists in cell formation after exposure to antibiotics in the planktonic and biofilm state. **Rev. Scientific Reports**. Jul, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20323-3>.

PANG, Z; RAUDONIS, R; GLICK, R; LIN, J; CHENG, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnol. Rev. Science Direct**. Fev, 2019. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.

QUEIROZ, C. **Qualificação da atividade inibitória da cafeína sobre motilidade e formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação de Mestrado– Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, página 17-18.

QIU, H; FEI, X; YANG, J; QIAO, Z; YUAN, S; ZHANG, H; HE, L; ZHANG, A. Bischler-Napieralski and homo-Mannich sequence enables diversified syntheses of sarpagine alkaloids and analogues. **Nat Commun**. 2023 Sep 9;14(1):5560. doi: 10.1038/s41467-023-41268-9.

RIQUELME, SA; LIIMATTA, K.; WONG Fok Lung, T.; CAMPOS, B.; AHN, D.; CHEN, D.; LOZANO, C.; SÁENZ, Y.; UHLEMANN, AC; KAHL, BC. *Pseudomonas aeruginosa* uses host-derived itaconate to redirect its metabolism to promote biofilm formation. **Rev. Célula Metab. 2020**.

RUDRA, B; DUNCAN, L; SHAH, A.; SHAH, A; GUPTA, R. Phylogenomic and comparative genomic studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains: a proposal to transfer the strains of a clade of the noxious species *Pseudomonas paraaeruginosa*. **Rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Nov 2022. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005542>.

RUMBAUGH, KP, SAUER, K. Biofilm dispersion. **Rev. Nature Microbiology**. Jun, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>.

RYBENKOV, V; ZGURSKAYA, I; GANGULY, C; LEUS, V; ZHANG, Z; MONIRUZZAMAN, M. The Whole Is Bigger than the Sum of Its Parts: Drug

Transport in the Context of Two Membranes with Active Efflux. **Rev. Chemical.** Mai, 202. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01137.

SCOFFONE, C., TRESPIDI, G., CHIARELLI, R., BARBIERI, G., BURONI, S. Quorum Sensing as an antivirulence target in cystic fibrosis pathogens. **Rev. International Journal Molecular Sciences.** Apr, 2019. doi: 10.3390/ijms20081838

SIDDIQUI, Z., FAROOQ, F., ANIS AHMAD, TN., KHAN, A. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of new halopyrazole derivatives. **Rev. Journal of Saudi Chemical Society.** Abr, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.03.016>.

SILVA, Luiz André. **Novos Derivados Sintéticos De Alcaloides Tetrahydroisoquinolínicos.** Mai, 2016. 83 F. Dissertação (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 27.05.2016.

SIMANEK, A., SCHUMACHER, L., MALLERY, P., SHEN, S., LI, L., PACZKOWSCK, J. Quorum sensing synthase mutations recalibrate autoinducer concentrations in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates to improve pathogenesis.. **Rev. Nature Communications.** Dez, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43702-4>.

SOARES, A., ROUSSEL, V., PESTEL-CARON, M., BARREAU, M., CARON, F., BOUFFARTIGUES, E., CHEVALIER, S., ETIENNE, M Understanding ciprofloxacin failure in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: persistent cells survive matrix disruption. **Rev. Fronteiras em Microbiologia.** Nov, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.02603.

SOURAV, B. **bactérias Gram Negativas - Definição, Estrutura, Características, Importância.** Jun, 2023. Disponível em: <<https://microbiologynote.com/pt/gram-negative-bacteria-definition-structure-characteristics-importance/>> Acesso em: Agosto, 2023.

SUSHMITHA, J., RAJEEV, M., KATHIRKAMAN, V., Shivam, S., Rao, T., Pandian, S. 3-hydroxycoumarin demonstrates anti-biofilm and anti-hyphal efficacy against *Candida albicans* through inhibition of cell adhesion, morphogenesis and regulation of virulent genes. **Rev. Scientifics Reports.** Jul, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37851-1>. APUD: Repp, K., Scott, A., Pettit, R. **Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms,** *Rev. Medical Mycology.* Nov, 2007 <https://doi.org/10.1080/13693780701581458>.

WADHWA, N., BERG, C. Bacterial motility: machines and mechanisms. **Rev. Nature Microbiology.** Set, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00626-4>.

YAN, S.; WU, G. Can Biofilm Be Reversed Through Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*?. **Rev. Front. Microbiology.** Jul, 2019.