

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

ANDRESSA CRISTINA DAMIM

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE
CLORIDRATOS DE 4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL-1-
CARBOXIMIDAMIDAS FRENTE A ISOLADOS DE *Salmonella* spp.
E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE**

DOURADOS-MS

2017

ANDRESSA CRISTINA DAMIM

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE
CLORIDRATOS DE 4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL-1-
CARBOXIMIDAMIDAS FRENTE A ISOLADOS DE *Salmonella* spp.
E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. KELLY MARI PIRES DE OLIVEIRA

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração Ciência Ambiental.

DOURADOS-MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

D158a Damim, Andressa Cristina

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de cloridratos de 4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboximidamidas frente a isolados de *Salmonella* spp. e ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade / Andressa Cristina Damim -- Dourados: UFGD, 2017.

55f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Kelly Mari Pires de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. *Salmonella* spp.. 2. Biofilmes. 3. Núcleos pirazolínicos. 4. Citotoxicidade. 5. Teste de Ames. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de cloridratos de 4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboximidamidas frente isolados de *Salmonella ssp.* e ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade**", de autoria de **Andressa Cristina Damim**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof.^a Dr.^a Kelly Mari Pires de Oliveira
Presidente da banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi
Membro Examinador (UEM)

Prof. Dr. Lucas Pizzuti
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 21 de agosto de 2017.

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Antonio
e Creusa e a meu namorado Danilo, que tanto
incentivam meu crescimento pessoal
e profissional.

“O aprendizado nunca termina. Não existe parte da vida que não contenha lições. Se você está vivo, há lições para aprender.”

(Autor Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por proporcionar esta oportunidade em minha vida, por me dar saúde, força e coragem para seguir firme na caminhada superando as dificuldades e alcançando meus objetivos. A ele toda honra e toda glória, agora e para sempre!

Aos meus pais Antonio e Creusa, por serem meus maiores incentivadores, por todo o apoio, carinho, dedicação e amor incondicional e pelo exemplo de garra, determinação e fé.

Agradeço especialmente a meu namorado Danilo, por seu amor e dedicação, por seu companheirismo e amizade e pela parceria fundamental no desenvolvimento desta pesquisa.

A professora Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira, por sua orientação e dedicação, por todo conhecimento repassado, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de fazer parte da família LMA.

Ao professor Dr. Lucas Pizzuti pela parceria no desenvolvimento deste trabalho, proporcionando a síntese dos compostos utilizados nesta pesquisa.

A professora Dra. Melyssa Negri por contribuir com a análise de citotoxicidade, realizada em seu laboratório na Universidade Estadual de Maringá.

Aos meus colegas de laboratório, Fernanda, Melina, Helene, Pamella, Bianca, Pâmela, Jhon, Allan e Pedro que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, também a Carol, Karina e Daiane estagiárias que se tornaram parte da família LMA e especialmente as Mestras Fabiana, Adriana e Renata que tanto ajudaram com seus conhecimentos e execução dos experimentos. Agradeço a todos pelo apoio, por toda ajuda e principalmente pela amizade conquistada que levarei para sempre. Obrigada família LMA!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia e a Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de adquirir conhecimento, pelo apoio e incentivo às pesquisas científicas.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) pelo apoio financeiro concedido.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt – Acetato de Etila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLO – Cloranfenicol

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂ – Gás Carbônico

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade Óptica

DTA – Doença Transmitida por Alimentos

FACET – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia

FBS – Fetal Bovine Serum

FDA – Food and Drug Administration

FUNDECT – Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul

g – Gramas

h – Horas

HCl – Ácido Clorídrico

H₂O – Água

IM – Índice de Mutagenicidade

KOH – Hidróxido de Potássio

LMA – Laboratório de Microbiologia Aplicada

LSCM – Laboratório de Síntese e Caracterização Molecular

MeOH – Metanol

min – Minutos

mL – Mililitro

mmol – Milimol

MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazólio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm – Nanômetros

OECD - Organization for the Economic Cooperative and Development

PBS – Phosphate Buffered Saline

pH – Potencial Hidrogeniônico

RPM – Rotações por minuto

TSA – Trypticase Soy Agar

TTC – Triphenyl Tetrazolium Chloride

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

WHO - World Health Organization

2-ANTR - 2-aminoantraceno

µg – Microgramas

µL – Microlitros

°C – Grau Celsius

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade dos compostos 1 e 2 frente às cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	38
Tabela 2: Percentual de viabilidade celular das linhagens HeLa e Vero tratadas com os compostos 1 e 2.....	43
Tabela 3: Atividade mutagênica do composto 1 com a linhagem TA100 de <i>S. Typhimurium</i> expresso pela média de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM) com (S+) e sem (S-) ativação metabólica.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas moleculares dos cloridratos de 4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-carboximidamidas 1 e 2	16
Figura 2: Estrutura molecular da pirazolina e do pirazol.....	19
Figura 3: Estrutura de fármacos contendo núcleo pirazolínico ou pirazólico.....	20
Figura 4: Quantificação de células viáveis em log ₁₀ UFC das cepas de <i>Salmonella</i> spp. tratadas com diferentes concentrações do composto 1 (A) e do composto 2 (B), por meio da ANOVA e pós-teste de Tukey.....	40
Figura 5: Atividade do composto 1 (A) e do composto 2 (B) na formação de biofilmes de <i>Salmonella</i> spp. por meio da ANOVA e pós-teste de Tukey.....	42
Figura 6: Leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos 1 e 2 frente <i>Salmonella</i> spp.....	51
Figura 7: Teste de Ames método de microssuspensão Kado com o composto 1	51

RESUMO

Damim, A. C. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE CLORIDRATOS DE 4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL-1-CARBOXIMIDAMIDAS FRENTE A ISOLADOS DE *Salmonella* spp. E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE. Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul - Brasil.

Salmonella spp. é um dos principais microrganismos causadores de doenças veiculadas por alimentos no mundo. Os biofilmes, relacionados a falhas nos procedimentos de higiene, apresentam um problema clínico e econômico nas doenças transmitidas por *Salmonella* spp., em saúde pública e na indústria de alimentos. Na busca por substâncias que atuem contra estes microrganismos, compostos com núcleo pirazolínico vêm apresentando resultados importantes. Assim, investigamos a atividade antimicrobiana e antibiofilme de dois novos cloridratos de 4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboximidamidas, trifluórmetil (1) e bromofenil-substituídos (2) frente isolados de *Salmonella* spp. e os potenciais citotóxico e mutagênico. Pelo teste de microdiluição em caldo foi determinada a concentração inibitória mínima de 62,5 µg/mL para o composto 1 e de 125 µg/mL para o composto 2. Na atividade antibiofilme determinada pelo percentual de viabilidade celular, o composto 1 reduziu até 34% e o composto 2 até 21% a formação de biofilmes na concentração 62,5 µg/mL. O percentual de viabilidade celular mostrou potencial citotóxico apenas do composto 2 para as linhagens celulares HeLa (tumerais) e Vero (não tumerais). No teste de Ames, realizado com o composto 1, não foi detectada mutagenicidade para a linhagem TA100 de *Salmonella* Typhimurium até a concentração de 500 µg/placa. Ambos compostos mostraram atividade antimicrobiana e antibiofilme frente a cepas de *Salmonella* spp. O composto 1 foi o mais promissor devido às propriedades apresentadas. Estes compostos podem ser alternativas para tratamento e controle de *Salmonella* atuando como agentes sanificantes principalmente na indústria de alimentos.

Palavras-chave: *Salmonella* spp, biofilmes, núcleos pirazolínicos, citotoxicidade, teste de Ames.

ABSTRACT

Damim, A. C. ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF 4,5-DIYIDRO-1H-PYRAZOL-1-CARBOXYMIDAMID CHLORIDRATES IN FRONT OF ISOLATED *Salmonella* spp. AND CYTOTOXICITY AND MUTAGENICITY TESTS. Master in Environmental Science and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul - Brazil.

Salmonella spp. is one of the major microorganisms that cause foodborne illness in the world. Biofilms, related to flaws in hygiene procedures, present a clinical and economic problem in diseases transmitted by *Salmonella* spp., in public health and in the food industry. In the search for substances that act against these microorganisms, compounds with pyrazoline nucleus have presented important results. Thus, we investigated the antimicrobial and antibiofilm activities of two novel hydrochlorides of 4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboximidamides, trifluoromethyl (1) and bromophenyl-substituted (2) against isolated *Salmonella* spp., and its cytotoxic and mutagenic potentials. The broth micro dilution test determined the minimum inhibitory concentration of 62,5 µg/mL for the compound 1 and 125 µg/mL for the compound 2. In the antibiofilm activity determined by percent cell viability, the compound 1 reduced up to 34% and the compound 2 reduced to 21% of the biofilm formation at the concentration 62,5 µg/mL. The percentage of cell viability showed cytotoxic potential only of the compound 2 for HeLa (tumoral) and Vero (non-tumoral) cell lines. In the Ames test, performed with the compound 1, no mutagenicity was detected for the TA100 strain of *Salmonella* Typhimurium up to the concentration of 500 µg/plates. Both compounds showed antimicrobial activity and antibiofilm against strains of *Salmonella* spp. The compound 1 was the most promising because of the properties presented. These compounds may be alternatives for treatment and control of *Salmonella* acting as sanitizing agents mainly in the food industry.

Key words: *Salmonella* spp, biofilms, pyrazolinic nuclei, cytotoxicity, Ames test.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. Salmonelose.....	17
2.2. Biofilmes.....	18
2.3 Pirazolinias.....	19
2.4 Citotoxicidade.....	20
2.5 Mutagenicidade.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. REFERÊNCIAS.....	25
5. ARTIGO.....	32
6. CONCLUSÃO GERAL.....	50
7. ANEXOS.....	51

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os microrganismos patogênicos são constante preocupação quando o assunto é saúde pública, pois as doenças que eles podem transmitir levam milhares de indivíduos à morte todos os anos em todo o mundo (WHO, 2013). Dentre estas doenças, as gastroenterites são muito comuns e, geralmente, são transmitidas pelo consumo de alimentos ou água contaminados por microrganismos patogênicos.

Dentre os principais causadores de gastroenterites, estão os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, com destaque para o gênero *Salmonella*. Estas enterobactérias são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, que podem se instalar no trato gastrointestinal do homem e de animais de sangue quente (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012). O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *enterica* e *bongori* e possui mais de 2.500 sorotipos ou sorovares (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; WHO, 2013).

Salmonella enterica sorovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) são os principais agentes etiológicos causadores de salmoneloses (WHO, 2013), doenças transmitidas por alimentos contaminados que atingem seres humanos e animais. Já a *Salmonella enterica* sorovar Typhi (*S. Typhi*) é a principal causa da febre tifoide, doença restrita a seres humanos (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012). Surtos de doenças causadas por *Salmonella* são recorrentes em regiões sem saneamento básico, onde a água é um dos principais fatores de contaminação e também pelo consumo de carne de aves, ovos e derivados contaminados pelo microrganismo (RIBEIRO et al., 2007).

Um fator que torna difícil o controle deste patógeno e o tratamento de infecções é a seleção de microrganismos resistentes, que ocorre pelo uso indiscriminado e mal orientado de antibióticos. Outro fator importante é a capacidade que *Salmonella* possui de formar biofilmes e se aderir a diferentes superfícies, tornando-se um potencial veículo para contaminação, principalmente de alimentos (OLIVEIRA et al., 2007). Há uma grande preocupação quanto à formação de biofilmes em superfícies de manipulação de alimentos, seja em ambientes domésticos ou no processamento que ocorre nas indústrias e ainda, na criação de frangos de corte, já que as aves podem servir de reservatórios para estes microrganismos patogênicos (PANZENHAGEN et al., 2016).

Neste sentido é importante buscar alternativas, encontrar novos antimicrobianos e agentes sanificantes para o controle de microrganismos patogênicos nestes ambientes (AKHTAR et al., 2013). Na literatura, compostos pirazolínicos halogenados vem sendo

objeto de investigações por apresentarem diversas propriedades biológicas, dentre elas antimicrobianas (JAMWAL et al., 2013; VIVEKA et al., 2015; SID et al., 2016). Desai *et al.*, 2012 mostraram a atividade de compostos 2-(5-(3-(4-fluorfenil)-1-fenil-1*H*-pirazol-4-il)-3-(aril)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-il)tiazol-4(5*H*)-onas contra bactérias Gram-negativas, assim como Miniyar, Barmade & Mahajan, 2015 que testaram o composto 1-(5-(2-cloroquinolin-3-il)-3-(4-fluorfenil)-1*H*-pirazol-1-il)etanona contra *E. coli* e obtiveram importante atividade antimicrobiana. Além disso, Oliveira *et al.*, 2014, avaliaram compostos 5-(2-bromofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamidas, que apresentaram ação fungicida contra leveduras do gênero *Candida*. Também Miniyar, Barmade & Mahajan, 2015 testaram compostos 1-(3-(4-bromofenil)-5-(2-coroquinolin-3-il)-1*H*-pirazol-1-il)etanonas e obtiveram atividade bacteriostática contra *E. coli*.

Assim, a partir da síntese de dois novos cloridratos de 4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamidas, triflúormetil (1) e bromofenil-substituídos (2) (Figura 1), foram investigadas sua atividade antimicrobiana e antibiofilme frente cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango, além de avaliados seus potenciais citotóxico e mutagênico.

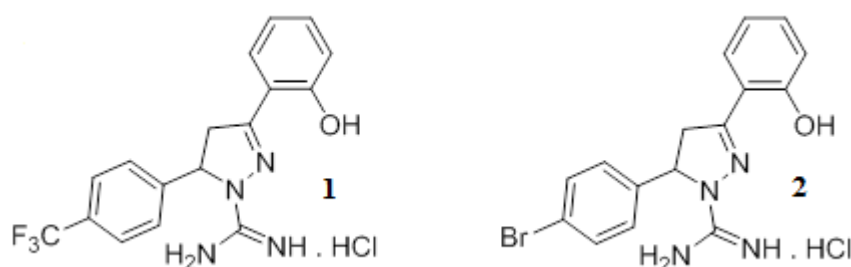


Figura 1: Estruturas moleculares dos cloridratos de 4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamidas **1** e **2**.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Salmonelose

As salmoneloses são infecções entéricas causadas por bactérias do gênero *Salmonella* e estão entre as principais doenças que podem ser transmitidas pelo consumo de alimentos e água contaminados, sendo um dos principais problemas em saúde pública no mundo (DÍEZ-GARCÍA, CAPITA & ALONSO-CALLEJA, 2012; CORRÊA et al., 2014). *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis tem sido a mais relacionada com casos de salmonelose nas últimas décadas, sendo o sorotipo mais preocupante (VALERIANO et al., 2012).

A capacidade de invasão intestinal é um importante fator de virulência do gênero *Salmonella*, característica que se deve ao fato dos sorotipos da espécie *enterica* possuir o operon de genes Inv (*invasibility*) (GALDINO et al., 2013). Os sintomas das salmoneloses aparecem de 12 a 72 horas após a ingestão de alimentos contaminados, sendo febre, dores abdominais, diarreia, náuseas e vômito e podem durar alguns dias (WHO, 2013). Na maioria dos casos não é necessário o tratamento com antibióticos, ocorrendo rápida recuperação, porém, para pessoas imunocomprometidas pode haver rápida evolução e nos casos mais graves a septicemia pode levar a morte (GUO et al., 2011).

Muitos alimentos são considerados importantes veículos de transmissão de *Salmonella* spp., como carnes de aves, carnes bovinas e suínas, ovos e derivados (OKAMURA et al., 2001; SHINOHARA et al., 2008). Além disso, a carne de frango tem sido identificada como a principal fonte de transmissão de *Salmonella* spp. (GUO et al., 2011; GRANT, HASHEM & PARVEEN, 2016; PANZENHAGEN et al., 2016).

Na criação de aves comerciais, preocupa-se muito com a contaminação de carcaças e ovos por *Salmonella* spp. A bactéria pode se instalar no trato gastrointestinal das aves e ser disseminada através de suas excreções, contaminando assim o ambiente, os ovos no momento da postura e utensílios utilizados para o abate e processamento (OKAMURA et al., 2001; CASTELIJN et al., 2012).

Em busca de diminuir a contaminação e principalmente para estimular um rápido crescimento dos frangos de corte, utilizam-se agentes antimicrobianos na suplementação de seus alimentos, o que acaba culminando no desenvolvimento de cepas multirresistentes (HAO et al., 2014; GRANT et al., 2016).

Dados do Ministério da Saúde apontam que no Brasil, de 2000 a 2015, mais de 10 mil surtos por doenças transmitidas por alimentos foram notificados, tendo *Salmonella* spp.

como agente etiológico responsável por 14,4% destes surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), o governo americano estima que ocorram cerca de 130 mil hospitalizações a cada ano nos Estados Unidos, devido ao consumo de alimentos contaminados por bactérias e o número de mortes pode chegar até 3 mil (FDA, 2015).

Os custos gerados para o tratamento de salmoneloses são de grande impacto econômico para a indústria médica e também agropecuária (CORRÊA et al., 2014). O *World Health Organization* (WHO) estima que bilhões de dólares sejam gastos por ano, devido a estas doenças, por isso é tão importante o seu controle e prevenção (WHO, 2013).

2.2 Biofilmes

Para a patogenicidade de *Salmonella*, é essencial a fixação às células do hospedeiro, a persistência ambiental e a formação de biofilmes (GIBSON et al., 2007; GALDINO et al., 2013).

Um biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas, dentro de uma matriz polimérica microbiana, aderida a uma superfície, inerte ou biológica. Os microrganismos podem aderir-se a diferentes superfícies, interagindo com as mesmas e iniciando um processo de multiplicação celular (OLIVEIRA et al., 2007). A matriz extracelular secretada durante o processo de construção do biofilme apresenta perfil complexo, constituído por proteínas, DNA, RNA, lipídeos e íons. Além disso, os exopolissacarídeos são fundamentais no estabelecimento e fixação, já os apêndices extracelulares filamentosos, como flagelos e fímbrias, desempenham papel complementar no processo de adesão (BRANDA et al., 2005).

Quando estabelecidos, os microrganismos se destacam do biofilme atuando como uma importante fonte de contaminação, trazendo danos para a qualidade dos alimentos, fazendo com que produtos se tornem portadores potenciais de organismos patogênicos (FLACH et al., 2005; MARQUES et al., 2007; SHI & ZHU, 2009). O biofilme ocorre naturalmente em vários tipos de ambientes. Na indústria de alimentos, falhas no processo de higienização permitem que resíduos aderidos a superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação.

No caso da *Salmonella*, a cadeia de produção de alimentos que inclui a indústria primária, serviços e instituições alimentícios e ambientes domésticos são, muitas vezes, os locais propícios para seu desenvolvimento. Diversos autores afirmam que este

microrganismo é capaz de formar biofilme e, conseqüentemente, contaminar alimentos em diferentes superfícies abióticas como o plástico, borracha, cimento, vidro e aço inoxidável (MORETRO et al., 2009; STEENACKERS, 2011; DÍEZ-GARCÍA, CAPITA & ALONSO-CALLEJA, 2012). A organização e características físico-químicas da matriz extracelular e células bacterianas, conferem ao biofilme um perfil fenotípico de resistência a agentes antimicrobianos e sanificantes, por esse motivo, sua eliminação das instalações de processamento de alimentos tornou-se um grande desafio (PAPAVASILEIOU et al., 2010).

Na criação de frangos de corte, a contaminação de carcaças por *Salmonella* spp. pode aumentar significativamente durante a etapa de processamento, devido a presença de biofilmes nas superfícies de manipulação de alimentos (SÁNCHEZ et al., 2002). Além disso, utilizar as mesmas ferramentas e equipamentos para o abate de um grande número de animais pode contribuir para a contaminação cruzada, sendo necessária a separação física de materiais sujos e limpos e adotar medidas de desinfecção (BUNCIC, 2006; BUNCIC & SOFOS, 2012). Biofilmes também podem permanecer em caixas utilizadas para o transporte de animais aos abatedouros, pois a lavagem e desinfecção desses utensílios podem não ser suficientes para sua eliminação (BUNCIC & SOFOS, 2012).

Em ambientes domésticos também existem riscos potenciais de ocorrerem contaminações cruzadas. A preparação de alimentos como frango cru, pode favorecer a disseminação de *Salmonella* para superfícies de contato com alimentos e para as mãos dos manipuladores (CARRASCO, MORALES-RUEDA & GARCÍA-GIMENO, 2012). Assim, é fundamental o controle e eliminação destes patógenos nestes ambientes e novos compostos devem apresentar atividade antibiofilme além da atividade antimicrobiana.

2.3 Pirazolinás

As pirazolinás são compostos cíclicos de cinco membros que possuem dois átomos de nitrogênio adjacentes nas posições 1 e 2 do anel, classificados como 1,2-diazóis (Figura 2).

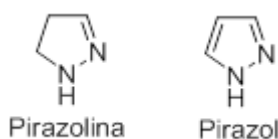


Figura 2: Estrutura molecular da pirazolina e do pirazol.

Na química medicinal, pirazolinas e seus derivados despertam interesse por suas várias atividades biológicas de amplas aplicações, sendo antimicrobianos, anti-inflamatórios, antidepressivos, anticonvulsivos e antitumorais (NETTO et al., 2008; JAMWAL et al., 2013; ALTINTOP et al., 2014). Existem alguns fármacos já comercializados que possuem núcleo pirazólico ou pirazólico na sua composição, tais como a Dipirona que atua como agente analgésico e anti-inflamatório, o Celecoxibe que também é utilizado como anti-inflamatório e analgésico e ainda a Piraclostrobina, que atua como fungicida na agroquímica (PENNING et al., 1997; VICENTINI et al., 2013; JOSHI et al., 2014) (Figura 3).

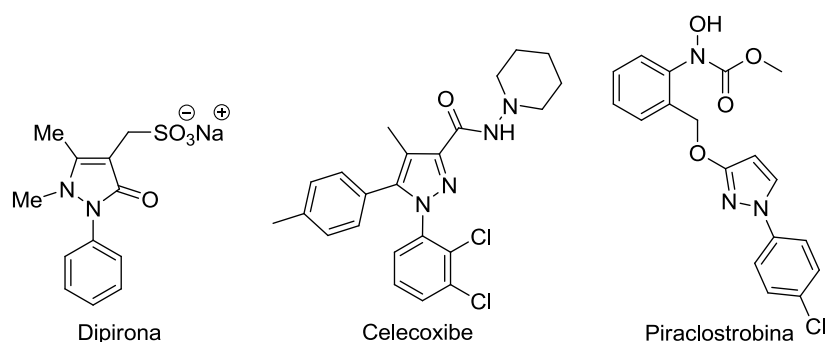


Figura 3: Estrutura de fármacos comerciais contendo núcleo pirazólico ou pirazólico.

Na busca pelo desenvolvimento de drogas farmacêuticas mais ativas e seletivas, utiliza-se a inclusão de diferentes substituintes a estes núcleos. Entre os compostos heterocíclicos, os que apresentam como substituintes grupos halogenados como o flúor e bromo têm mostrado papel importante do ponto de vista biológico, apresentando atividade farmacológica (NAVARINI, 2008). A inclusão de um átomo de flúor em uma droga pode influenciar na sua conformação e interação com o alvo farmacológico, melhorando a sua distribuição e liberação nos tecidos (PARK & KITTERINGHAM, 1994; MARTINS et al., 2006; BONACORSO et al., 2011).

Oliveira *et al.*, 2014 citam a lipofilicidade apresentada por compostos bromo-substituídos, esta lipofilicidade que também é apresentada pelos átomos de flúor proporciona uma maior permeabilidade nas membranas celulares, facilitando o transporte dentro dos sistemas biológicos (MARTINS et al., 2006; BONACORSO et al., 2011).

2.4 Citotoxicidade

Antes de utilizar qualquer substância em seres humanos, é fundamental realizar análises para detectar possíveis potenciais citotóxicos e garantir que não haja riscos para a saúde humana (ROGERO et al., 2003).

A citotoxicidade é a propriedade de uma substância em causar danos às células, podendo levá-las a apoptose. Testes *in vitro* para avaliar citotoxicidade têm sido muito utilizados em laboratórios pois levam menos tempo de desenvolvimento, custam menos, e são geralmente de reprodutibilidade mais fácil do que testes *in vivo*, além do uso de animais em laboratórios ter sido cada vez mais reduzido (ROGERO et al., 2003).

Dentre os ensaios para citotoxicidade, temos o teste com culturas de células, o teste do Micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de camundongos, o teste de *Allium cepa* para vegetais e o teste com *Artemia salina* para crustáceos (ROGERO et al., 2003; SILVA et al., 2010; GOMES et al., 2016). A análise da viabilidade celular utilizando cultura de células tem sido amplamente utilizada e consiste na exposição direta ou indireta de células de mamíferos frente aos compostos a serem analisados, verificando alterações por meio da inibição de colônias celulares ou pela incorporação de marcadores, que diferenciam células vivas de mortas ou danificadas, medindo a intensidade de cor das culturas celulares (CIAPETTI et al., 1996; ROGERO et al., 2003). Alguns corantes indicadores provaram ser úteis como marcadores de viabilidade celular, como o reagente MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, amplamente utilizado em testes com culturas celulares (RISS & MORAVEC, 2004).

Entre as principais culturas celulares de referência mundial estão as linhagens HeLa, cultivo de células extraídas de tecido canceroso do colo do útero de Henrietta Lacks (células tumorais), e a linhagem Vero, células epiteliais extraídas dos rins de macacos-verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) (células não tumorais), ambas utilizadas em variados estudos e testes, incluindo avaliações de citotoxicidade (BRETAS, 2010; CALDAS, 2010; BARBOSA et al., 2015). É importante utilizar linhagens tumorais e não tumorais nestes testes, para que haja um parâmetro de comparação da atividade dos compostos entre os diferentes tipos celulares. Além disso, novos compostos devem ser avaliados ainda, quanto ao seu potencial mutagênico.

2.5 Mutagenicidade

A mutagenicidade é definida como a capacidade de uma substância em interagir com o material genético (DNA) causando danos a ele (BENIGNI & BOSSA, 2011). As mutações podem ocorrer nos genes, onde uma ou algumas bases podem ser modificadas, inseridas ou excluídas, como grandes deleções ou rearranjos de DNA, quebras ou rearranjos cromossômicos ou como ganho ou perda de cromossomos inteiros (AMES et al., 1973a; TEJS, 2008).

Agentes químicos mutagênicos podem causar problemas de fertilidade e levar mutações a gerações futuras, além de muitos possuírem potencial carcinogênico e, por esta razão, regulamenta-se que testes de mutagenicidade sejam realizados com novos compostos a fim de detectar substâncias com esta capacidade e garantir que não haja riscos para a saúde (TEJS, 2008).

Dentre os ensaios para avaliação da mutagenicidade, estão o teste de Ames em microrganismos, o *Allium cepa* realizado com plantas, o teste do micronúcleo em eritrócitos de roedores e o ensaio mutagênico em insetos com *Drosophila melanogaster* (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015; ROBERTO et al., 2016; STAMENKOVIĆ-RADAK & ANDJELKOVIĆ, 2016).

Em 1973, Bruce Ames desenvolveu um teste capaz de detectar a mutagenicidade de agentes químicos e o chamou de teste de Ames, também conhecido por ensaio *Salmonella*/microsoma. Este é um ensaio amplamente utilizado para detectar substâncias que possam causar danos e mutações genéticas (OECD, 1997) e consiste em utilizar linhagens de *Salmonella* Typhimurium que possuem diferentes mutações no operon do aminoácido histidina (*his*⁻), que as tornam incapazes de sintetizá-lo e já que este é um aminoácido essencial para o crescimento de colônias bacterianas, na presença de substâncias mutagênicas ocorre uma reversão dessa característica e as colônias passam a crescer em meio desprovido deste aminoácido (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; TEJS, 2008).

As linhagens de *Salmonella* Typhimurium geralmente utilizadas para avaliar a mutagenicidade são a TA97a ou TA1537, TA98 e TA100, TA1535 ou TA102 e cada linhagem apresenta mutações genéticas que aumentam a sensibilidade na detecção de agentes mutagênicos (MORTELMANS & ZEIGER, 2000), sendo a TA98 e TA100 as mais utilizadas no teste de Ames, e detectam mutações por deslocamentos no quadro de leitura e substituição dos pares de bases, respectivamente. Como estas bactérias não possuem enzimas de metabolização utiliza-se a adição de um fator de metabolização exógena, a “fração S9”, que contém enzimas extraídas do fígado de ratos e simula a metabolização feita por este órgão nos mamíferos, assim, o teste ganha mais sensibilidade para detectar os compostos com mutações indiretas (MARON & AMES, 1983).

Na produção de novos fármacos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a *Organisation for the Economic Cooperative and Development* (OECD) preconizam que todo candidato a fármaco seja testado quanto à mutagenicidade (HARDING et al., 2015). Além disso, o teste de Ames foi incluído como parte dos ensaios internacionalmente propostos para registro de medicamentos e formulações químicas (FDA,

2012; ISO, 2014) por isso, este teste tem se tornado uma importante ferramenta de análise química para novos compostos (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antimicrobiano e antibiofilme de dois novos cloridratos de 4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamidas (1 e 2) frente a isolados de *Salmonella* spp. além de avaliar sua citotoxicidade e a mutagenicidade.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima do cloridrato de 3-(2-hidroxifenil)-5-(4-(trifluormetil)fenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (1) e de 5-(4-bromofenil)-3-(2-hidroxifenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (2) frente cepas de *Salmonella* spp.
- Avaliar a atividade dos compostos na formação de biofilmes por *Salmonella* spp.
- Analisar o potencial citotóxico dos compostos utilizando culturas celulares com linhagens tumorais e não tumorais.
- Investigar a mutagenicidade do composto 3-(2-hidroxifenil)-5-(4-(trifluormetil)fenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (1) utilizando o teste de Ames.

4. REFERÊNCIAS

AKHTAR, M.; VIAZIS, S.; DIEZ-GONZALEZ, F. Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. *Food Control*, **2014**, 38, 67.

ALTINTOP, M. D.; OZDEMIR, A.; TURAN-ZITOUNI, G.; ILGIN, S.; ATL, O.; DEMIREL, R.; KAPLANCIKLI, Z. A. A novel series of thiazolyl-pyrazoline derivatives: Synthesis and evaluation of antifungal activity, cytotoxicity and genotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, 92, 342.

AMES, B. N; LEE, F. D; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A*, **1973a**, 70, 2281.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H. G.; MOURA-COSTA, G. F.; COSTA, M. A.; CAMPOS-SHIMADA, L. B.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L.; KANESHIMA, E. N.; BECKER, T. C. A.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **2015**, 174, 293.

BARBOSA, B. S; SANTOS, F. A; PIMENTEL, M. M. L; FERNANDES, D. P; PREXEDES, E. A; BEZERRA, M. B. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, **2015**, 9, 334.

BENIGNI, R; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. *Chemical Reviews*, **2011**, 111, 2507.

BONACORSO, H. G; PORTE, L. M. F; NAVARINI, J; PAIM, G. R; LUZ, F. M; OLIVEIRA, L. M; WHIETAN, C. W; MARTINS, M. A. P; ZANATTA, N. Chemoselective fluorination of 2-hydroxy-3,4,7,8-tetrahydro-2H-chromen-5(6H)-ones using DAST. *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 3333.

BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, **2005**, 13, 20.

BRETAS, R. M. Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais, 2011. 170p. (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. RJ, **2011**.

BUNCIC, S. (2006). Integrated food safety and veterinary public health. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI International Publishing.

BUNCIC, S; SOFOS, J. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International*, **2012**, *45*, 641.

CALDAS, C. Vida, morte e imortalidade: desvendando a história das células HeLa. *Ciência e Cultura [online]*, **2010**, *62*, 17.

CARRASCO, E; MORALES-RUEDA, A; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, **2012**, *45*, 545.

CASTELIJN, G. A. A.; PARABIRSING, J. A.; ZWIETERING, M. H.; MOEZELAAR, R.; ABEE, T. Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* and *S. Infantis*. *Veterinary Microbiology*, **2013**, *161*, 305.

CIAPETTI, G; GRANCHI, D; VERRI, E; SAVARINO, L; CAVEDAGNA, D; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials*, **1996**, *17*, 1259.

CORRÊA, F. E. L.; DANTAS, F. G. S.; GRISOLIA, A. B.; CRISPIM, B. A.; OLIVEIRA, K. M. P. Identification of class 1 and 2 integrons from clinical and environmental *Salmonella* isolates. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **2014**, *8*, 1518.

DESAI, N. C.; JOSHI, V. V.; RAJPARA K. M.; VAGHANI, H. V.; SATODIYA, H. M. Facile synthesis of novel fluorine containing pyrazole based thiazole derivatives and evaluation of antimicrobial activity. *Journal of Fluorine Chemistry*, **2012**, *142*, 67.

DÍEZ-GARCÍA, M; CAPITA, R; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, **2012**, *31*, 173.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, **2005**, *33*, 291.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **2012**. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). *In*: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Expert Working Group. 31. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 13/08/2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **2015**. Food. Foodborne Illness and Contaminants. Bacteria. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Bacteria/ucm20081848.htm>>. Acesso em: 16/10/2016.

GALDINO, V. M. C. A.; MELO, R. T.; OLIVEIRA, R. P.; MENDONÇA, E. P.; NALEVAIKO, P. C.; ROSSI, D. A. Virulence of *Salmonella* spp. of poultry products origin and antimicrobial resistance. *Bioscience Journal*, **2013**, 29, 932.

GIBSON, D. L.; WHITE, A. P.; RAJOTTE, C. M.; KAY, W. W. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology*, **2007**, 153, 1131.

GOMES, J. V. D.; FAITANIN, R. D.; BRASILEIRO, B. G.; SILVEIRA, D.; JAMAL, C. M. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades trombolítica e citotóxica de *cecropia hololeuca* miq. (urticaceae), *lippia alba* (mill.) N.e.br. Ex p. Wilson (verbenaceae) e *zanthoxylum rhoifolium* lam (rutaceae). *Infarma Ciências Farmacêuticas*, **2016**, 28, 10.

GORMAN, R; BLOOMFIELD, S; ADLEY, C. C. A study of cross-contamination of foodborne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, **2002**, 76, 143.

GRANT, A.; HASHEM, F.; PARVEEN, S. *Salmonella* and *Campylobacter*: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. *Food Microbiology*, **2016**, 53, 104.

GUO, C; HOEKSTRA, R. M; SCHROEDER, C. M; PIRES, S. M; ONG, K. L; HARTNETT, E; NAUGLE, A; HARMAN, J; BENNETT, P; CIESLAK, P; SCALLAN, E; ROSE, B; HOLT, K. G; KISSLER, B; MBANDI, E; ROODSARI, R; ANGULO, F. J; COLE, D. Application of Bayesian techniques to model the burden of human salmonellosis attributed to U.S. food commodities at the point of processing: adaptation of a Danish model. *Foodborne Pathogens Diseases*, **2011**, 8, 509.

HAO, H.; CHENG, G.; IQBAL, Z.; AI, X.; HUSSAIN, H. I.; HUANG, L.; DAI, M.; WANG, Y. LIU, Z.; YUAN, Z. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in Microbiology*, **2014**, 5, 288.

HARDING, A. P; POPELIER, P. L. A; HARVEY, J; GIDDINGS, A; FOSTER, G; KRANZ, M. Evaluation of aromatic amines with different purities and different solvent vehicles in the Ames test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2015**, 71, 244.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION (ISO). ISO 10993-3: **2014**: Biological evaluation of medical devices - Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity. Arlington: Association for the Advancement of Medical Instrumentation, 2014.

JAMWAL, A.; JAVED, A.; BHARDWAJ, V. A review on Pyrazole derivatives of pharmacological potential. *Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, **2013**, 3, 114.

JOSHI, J.; SHARMA, S.; GURUPRASAD, K.N. Foliar application of pyraclostrobin fungicide enhances the growth, rhizobial-nodule formation and nitrogenase activity in soybean (var. JS-335). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **2014**, 114, 61.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **1983**, 113, 173.

MARQUES, S. C.; REZENDE, J. G. O. S.; ALVES, L. A. F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian journal of Microbiology*, **2007**, 38, 538.

MARTINS, M. A. P.; PEREIRA, C. M. P.; MOURA, S.; FISS, G. F.; FRIZZO, C. P.; EMMERICH, D. J.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H. G. Preparation of novel 5-alkoxy-1,1,1,2,2-pentafluoroalk-4-en-3-ones and their application to a one-pot synthesis of azoles. *Arkivoc*, **2006**, 187.

MINIYAR, P. B.; BARMAD, M. A.; MAHAJAN, A. A. Synthesis and biological evaluation of 1-(5-(2-chloroquinolin-3-yl)-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl)ethanone derivatives as potential antimicrobial agents. *Journal of Saudi Chemical Society*, **2015**, 19, 655.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Relatório De Situação: Mato Grosso do Sul*. 2. ed, Brasília/DF, **2016**, 11.

MORETRO, T.; VESTBY, L. K.; NESSE, L. L.; HANNEVIK, S.; KOTLARZ, K.; LANSRUD, S. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, **2009**, 106, 12.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2000**, 455, 29.

NAVARINI, J. 5-trialometil-4,5-diidro-1H-1-(carbonilpiridil)pirazóis: Síntese e atividade biológica frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, 2008. 99p. (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, RS, **2008**.

NETTO, A. V. G.; FREM, R. C. G.; MAURO, A. E. A química supramolecular de complexos pirazólicos. *Química Nova*, **2008**, 31, 1208.

OECD, Organization for the Economic Cooperative and Development (OECD), 1997. Guidelines for the Testing of Chemicals: Bacteria Reverse Mutation Test, Guideline 471.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*, **2001**, *45*, 61.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J. OLIVEIRA R. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, **2007**, *38*, 318.

OLIVEIRA, S.; PIZZUTI, L.; QUINA, F.; FLORES, A.; LUND, R.; LENCINA, C.; PACHECO, B. S.; PEREIRA, C. M. P.; PIVA, E. Anti-*Candida*, Anti-Enzyme Activity and Cytotoxicity of 3,5-Diaryl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-1-carboximidamides. *Molecules*, **2014**, *19*, 5806.

PANZENHAGEN, P. H. N; AGUIAR, W. S; FRASÃO, B. S; PEREIRA, V. L. A; ABREU, D. L. C; RODRIGUES, D. P; NASCIMENTO, E. R; AQUINO, M. H. C. Prevalence and fluorquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Control*, **2016**, *61*, 243.

PAPAVASILEIOU, K.; PAPAVASILEIOU, E.; TSELENI-KOTSOVILI, A.; BERSIMIS, S.; NICOLAOU, C.; IOANNIDIS, A.; CHATZIPANAGIOTOU, S. Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella enterica* strains isolated from children with gastroenteritis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **2010**, *29*, 1401.

PARK, B. K; KITTERINGHAM, N. R. Effects of fluorine substitution on drug metabolism: Pharmacological and toxicological implications. *Drug Metabolism Reviews*, **1994**, *26*, 605.

PENNING, T. D.; TALLEY, J. J.; BERTENSHAW, S. R.; CARTER, J. S.; COLLINS, P. W.; DOCTER, S.; GRANETO, M. J.; LEE, L. F. MALECHA, J. W.; MIYASHIRO, J. M.; ROGERS, R. S.; ROGIER, D. J. YU, S. S.; ANDERSON, G. D.; BURTON, E. G.; COGBURN, J. N.; GREGORY, S. A.; KOBOLDT, C. M.; PERKINS, W. E.; SEIBERT, K.; VEENHUIZEN, A. W.; ZHANG, Y. Y.; ISAKSON, P. C. Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). *Journal of Medicinal Chemistry*, **1997**, *40*, 1347.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, **2007**, *38*, 296.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, **2004**, 2, 51.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. *Genetics and Molecular Biology*, **2016**, 39, 257.

ROGERO, S. O.; LUGAO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, **2003**, 6, 317.

SÁNCHEZ, M. X; FLUCKEY, W. M; BRASHEARS, M. M; MCKEE, S. R. Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. And *Salmonella* spp. In broilers processed in air-chilled and immersion-chilled environments. *Journal of Food Protection*, **2002**, 65, 948.

SHI, X; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, **2009**, 20, 407.

SHINOHARA, N. Z. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, **2008**, 13, 1675.

SID, A.; MESSAI, A.; PARLAK, C.; KAZANC, N.; LUNEAU, D.; KES, G.; RHYMAN, L.; ALSWAIDAN, I. A.; RAMASAMI, P. 1-Formyl-3-phenyl-5-(4-isopropylphenyl)-2-pyrazoline: Synthesis, characterization, antimicrobial activity and DFT studies. *Journal of Molecular Structure*, **2016**, 1121, 46.

SILVA, L. P.; BOSSO, A. A.; CARDOSO, S. C. Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa*. *Unopar Científica Ciências Exatas e Tecnológicas*, **2010**, 9, 67.

STAMENKOVIĆ-RADAK, M.; ANDJELKOVIĆ, M. Studying genotoxic and antimutagenic effects of plant extracts in *Drosophila* test systems. *Botanica Serbica*, **2016**, 40, 21.

STEENACKERS, H; HERMANS, K; VANDERLEYDEN, J; DE KEERSMAECKER, S. C. J. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, **2011**, 45, 502.

TEJS, S. The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*, **2008**, 4, 7.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10ª ed., Porto Alegre: Artmed, **2010**.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*, 5ª ed., São Paulo: Atheneu, **2008**.

VALERIANO, C; OLIVEIRA, T. L. C; CARVALHO, S. M; CARDOSO, M. G; ALVES, E; PICCOLI, R. H. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*, **2012**, 25, 673.

VICENTINI, C. B.; RAMACCIATO, J. C.; TEIXEIRA, R. G.; GROppo, F. C.; MOTTA, R. H. L. Comparative effect of sodium dipyrone and sodium dipyrone associated to caffeine to control post-tooth extraction pain. *Revista Dor Pesquisa Clínica e Terapêutica*, **2013**, 14, 174.

VIVEKA, S.; DINESHA.; SHAMA, P.; NAGARAJA, G. K.; BALLAV, S.; KERKAR, S. Design and synthesis of some new pyrazolyl-pyrazolines as potential anti-inflammatory, analgesic and antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, 101, 442.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013). *Salmonella* (nontyphoidal). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso em: 16/10/2016.

5. ARTIGO

Atividade antibiofilme de cloridratos de 4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboximidamidas frente isolados de *Salmonella* spp. testes de citotoxicidade e mutagenicidade

Andressa C. Damim¹, Danilo Y. Albuquerque¹, Fabiana G. S. Dantas³, XXX, Lucas Pizzuti¹, Kelly M. P. Oliveira².

¹ Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brasil.

² Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brasil

³ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brasil

Salmonella spp. é um dos principais causadores de surtos de doenças transmitidas por alimentos no mundo. A formação de biofilmes por *Salmonella* torna maior a sua patogenicidade, principalmente sobre superfícies de manipulação de alimentos. A busca por alternativas de controle deste patógeno nestes ambientes é fundamental. No presente estudo, foram avaliadas a atividade antimicrobiana e antibiofilme de dois novos cloridratos de 4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboximidamidas, trifluórmetil (1) e bromofenil-substituídos (2) frente isolados de *Salmonella* spp. No teste de microdiluição em caldo, a CIM de 62,5 µg/mL foi o melhor resultado obtido para o composto 1 que inibiu até 90% das cepas testadas. Os compostos apresentaram uma boa atividade antibiofilme, reduzindo até 34% da formação de biofilmes na concentração de 62,5 µg/mL do composto 1 e até 21% para o composto 2 na mesma concentração. A avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizada pela viabilidade celular por meio da redução de MTS com culturas de células HeLa (tumorais) e Vero (não tumorais). O composto 2 foi citotóxico para ambas linhagens celulares em todas as concentrações do teste, enquanto o composto 1 não apresentou citotoxicidade. Além disso, o teste de Ames foi realizado com a linhagem TA100 de *Salmonella* Typhimurium para avaliar a mutagenicidade do composto 1. Não foi detectado potencial mutagênico em nenhuma das concentrações. Assim, o composto 1 foi o mais promissor, porém, ambos podem ser alternativas para o controle de *Salmonella* spp., atuando como agentes sanitizantes.

1. INTRODUÇÃO

As salmoneloses são infecções entéricas causadas por bactérias do gênero *Salmonella* e estão entre as principais doenças transmitidas principalmente pelo consumo de alimentos e água contaminados, sendo um grande problema para a saúde pública no mundo (Díez-García, Capita & Alonso-Calleja, 2012; Corrêa *et al.*, 2014). Surtos destas doenças são comuns em regiões sem saneamento básico, onde a água é um dos principais fatores de contaminação e também pelo consumo de carne de aves, ovos e derivados contaminados (Ribeiro *et al.*, 2007).

A carne de frango tem sido identificada como a principal fonte de transmissão de *Salmonella* spp. (Guo *et al.*, 2011; Grant, Hashem & Parveen, 2016; Panzenhagen *et al.*, 2016) devido a capacidade da bactéria em se instalar no trato gastrointestinal destas aves, sendo disseminada através de suas excreções (Okamura *et al.*, 2001; Castelijns *et al.*, 2012). Para Sánchez *et al.*, 2002 a contaminação de carcaças de frango por *Salmonella* spp. pode aumentar significativamente durante a etapa de processamento na indústria, pela presença de biofilmes nas superfícies de manipulação de alimentos.

Quando se estabelecem, os microrganismos se destacam do biofilme e atuam como importante fonte de contaminação, comprometendo a qualidade dos alimentos e tornando-os portadores potenciais de organismos patogênicos (Flach *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2007; Shi & Zhu, 2009). As características físico-químicas da matriz extracelular conferem ao biofilme um perfil fenotípico de resistência a agentes antimicrobianos e sanitizantes. Por esse motivo, sua eliminação das instalações de processamento de alimentos tornou-se um grande desafio (Papavasileiou *et al.*, 2010). Assim, é importante buscar alternativas para o controle destes microrganismos patogênicos.

Na busca pelo desenvolvimento de drogas farmacêuticas mais ativas e seletivas, utiliza-se a inclusão de diferentes substituintes a estes núcleos. Entre os compostos heterocíclicos, os que apresentam como substituintes grupos halogenados como o flúor e bromo têm mostrado papel importante do ponto de vista biológico, apresentando atividade farmacológica (Navarini, 2008). A inclusão de um átomo de flúor em uma droga pode influenciar na sua conformação e interação com o alvo farmacológico, melhorando a sua distribuição e liberação nos tecidos (Park & Kitteringham, 1994; Martins *et al.*, 2006; Bonacorso *et al.*, 2011).

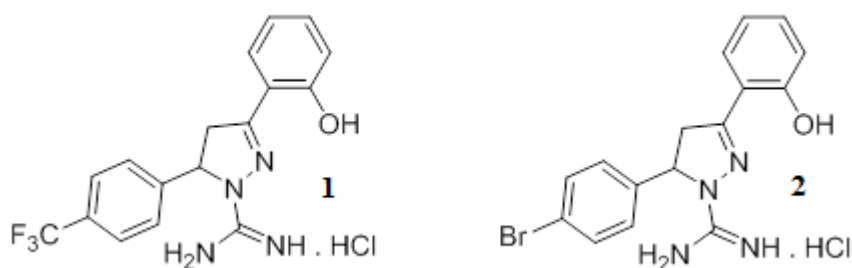
Paralelamente, agências reguladoras como a *Organization for the Economic Cooperative and Development* (OECD) determinam que todo candidato a fármaco seja

testado quanto a mutagenicidade (Harding *et al.*, 2015), para garantir que não haja riscos para a saúde (Tejs, 2008). Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana de cloridratos de 3-(2-hidroxifenil)-5-(4-(trifluormetil)fenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (1) e 5-(4-bromofenil)-3-(2-hidroxifenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (2), avaliar a ação contra a formação de biofilmes por *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango, além de analisar o seu potencial citotóxico e a mutagenicidade do composto 1.

2. MÉTODOS

2.1 Métodos de obtenção dos Cloridratos Pirazólicos

Os dois novos cloridratos de 4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamidas (estruturas 1 e 2) foram preparados no Laboratório de Síntese e Caracterização Molecular (LSCM) de acordo com metodologia proposta por Santos *et al.*, 2017.



2.2 Microrganismos

Foram testadas cinquenta cepas do gênero *Salmonella* isoladas de carcaças de frango provenientes do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) sendo seus sorotipos: Enteritidis, Infantis, Braenderup e Worthington, além de duas cepas de referência: *Salmonella* Enteritidis (13076) e *Salmonella* Typhimurium (14028), provenientes do *American Type Culture Collection*.

2.3 Concentração Inibitória Mínima

A atividade antimicrobiana dos compostos 1 e 2 foi determinada pelo teste de micro diluição em caldo, seguindo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) com algumas modificações.

Após cultivo em *Trypticase Soy Agar* (TSA) à 37°C por 24 h, os microrganismos foram padronizados em espectrofotômetro, num ajuste de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL a 625 nm.

Foram pesados 0,024 µg dos compostos, que precisaram ser diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%. Na microplaca de 96 poços foram adicionados o caldo Müller Hinton, o composto 1 ou 2 e feita a diluição seriada. As concentrações testadas foram 1.000 µg/mL a 1,9 µg/mL. Em seguida foram colocados os inóculos em duplicata e a microplaca foi incubada a 37°C por 24 h em câmara úmida. Como controle do ensaio foi utilizado o antibiótico Cloranfenicol. Para a leitura visual dos resultados, utilizou-se solução de *Triphenyl Tetrazolium Chloride* (TTC) a 0,1%. A CIM foi considerada como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento de colônias bacterianas. O teste foi realizado em duplicata em dois momentos distintos.

2.4 Redução em Logaritmos e Concentração Bactericida Mínima

Para avaliar a redução em logaritmos, foram escolhidos quatro dos isolados de *Salmonella*, representando os sorotipos Braenderup, Enteritidis, Worthington e Infantis, e as duas cepas padrão, *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e *S. Typhimurium* (ATCC 14028). O teste de microdiluição em caldo foi realizado conforme metodologia do item 2.3, porém, após período de incubação das microplacas, alíquotas de cada poço das concentrações foram passadas para novas microplacas com solução salina (0,85%) e feitas diluições seriadas até 10⁻⁸. Em seguida, alíquotas de 10 µL foram colocadas em placas com ágar Müller Hinton pela técnica *drop plate*. Após incubação de 24 h a 37°C, foi contado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e os resultados convertidos para Log₁₀ UFC. Os compostos foram testados nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL. A concentração bactericida mínima foi considerada a concentração em que nenhuma UFC foi contada. O experimento foi realizado em triplicata.

2.5 Avaliação da atividade antibiofilme

O teste foi realizado seguindo metodologia proposta por Costa *et al.*, 2014 com adaptações. Foram testados os mesmos isolados e cepas padrão do item 2.4. Após cultivo em TSA, foram coletadas algumas colônias bacterianas, ressuspensas em caldo Müller Hinton e incubadas em “shaker” a 80 RPM por 24 h. Após este período, centrifugaram-se os inóculos a 3.500 RPM e o sobrenadante foi desprezado. Os microrganismos aderidos foram lavados com *Phosphate Buffered Saline* (PBS, pH 7,4) e centrifugados por três vezes, para padronização em espectrofotômetro num ajuste de 1,5 x 10⁸ UFC/mL a 625 nm.

Foram pesados 0,024 µg dos compostos 1 e 2 e diluídos em DMSO a 5% e testados nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL (determinadas a partir da CIM). Após a

montagem das microplacas, elas foram incubadas em “shaker” a 80 RPM por 48 h para avaliar a presença dos compostos 1 e 2 na formação de biofilmes. Em seguida, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado três vezes com PBS para remoção das células não aderidas. Foram adicionados 100 µL de solução salina (0,85%) e com o auxílio de uma micropipeta foi feita a raspagem do fundo dos poços, para a remoção do biofilme formado. Em seguida, retiraram-se os 100 µL dos poços e realizaram-se diluições seriadas em solução salina. Alíquotas de 10 µL foram colocadas em placas com ágar Müller Hinton pela técnica *drop plate*. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e os resultados foram convertidos para Log₁₀ UFC. O experimento foi realizado em triplicata.

2.6 Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos 1 e 2 foi avaliada seguindo metodologia proposta por Capoci *et al.*, 2014 utilizando linhagens de células HeLa (Henrietta Lacks, cultivo de células extraídas de tecido canceroso de colo do útero) e Vero (células epiteliais extraídas dos rins de macacos-verdes africanos, *Cercopithecus aethiops*). As células HeLa (tumorais) foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS) e as células Vero (não tumorais) em meio RPMI 1640. As células foram ajustadas a 2x10⁵ células/mL e adicionadas em microplacas de 96 poços e incubadas sob 5% de CO₂ a 37°C por 24 h. Após este período, as células aderidas foram lavadas e tratadas com os compostos nas concentrações de 500, 150 e 15 µg/mL e incubadas sob as mesmas condições. Para o controle do crescimento (branco) foi utilizado o meio de cultura e a suspensão celular.

A viabilidade celular foi avaliada pela redução de MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazólio) em DMEM, sem vermelho de fenol. Após 3 h de incubação a 37°C, a absorbância de formazan foi medida no comprimento de onda de 490 nm, utilizando leitora de microplacas. Os valores de densidade óptica (DO) foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular dividindo o valor da absorbância da amostra pela absorbância do branco e multiplicando o resultado por 100. O ensaio foi realizado em triplicata em três momentos distintos.

2.7 Ensaio de Mutagenicidade

A mutagenicidade foi avaliada pelo teste de Ames, método de microssuspensão descrito por Kado *et al.*, 1983. Foi utilizada a linhagem de *Salmonella Typhimurium* TA100 padronizada na concentração de 1x10⁸ UFC/mL por centrifugação (10.000 RPM) e

ressuspensa em PBS (0,2 M, pH 7,4). Os ensaios foram realizados na presença e ausência da fração exógena, S9.

Foram adicionados em tubos de ensaio 50 µL de PBS ou a fração S9, 5 µL das concentrações do composto 1 (500, 150 e 15 µg/placa) e 50 µL da suspensão bacteriana. Os tubos foram pré-incubados por 90 minutos a 37°C. Logo após, foi adicionado 2 mL de top ágar (0,6 % de ágar, 0,6% de NaCl, 0,05 mM L-histidina, 0,05 mM biotina, pH 7,4, 45°C) e a mistura foi vertida em placas com ágar mínimo (1,5% de ágar, solução de Voguel-Boner 50x e solução de glicose 10%). As placas foram incubadas a 37°C por 48-66 horas e as colônias revertentes (His +) foram contadas. Como controle negativo, foi utilizado DMSO e como controles positivos foram utilizados azida sódica na ausência de S9 e 2-aminoantraceno na presença de S9. Os resultados foram avaliados pelo índice de mutagenicidade (IM), onde a amostra é considerada mutagênica quando há um aumento significativo no número de revertentes induzidos e o IM for ≥ 2 . Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPadPrism® 5.01, os resultados foram avaliados pela análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo pós-teste de Tukey, onde o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Para a mutagenicidade foi utilizado o programa estatístico Salanal® 1.0 avaliado pela ANOVA onde o $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois novos cloridratos de 4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamidas (1 e 2) foram testados contra cepas de *Salmonella* spp. e ambos apresentaram importante atividade antimicrobiana. O cloridrato de 3-(2-hidroxifenil)-5-(4-(trifluormetil)fenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (1) apresentou a melhor atividade antimicrobiana, pois a concentração de 62,5 µg/mL foi suficiente para inibir 50% e 90% das cepas de *Salmonella* spp. (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade dos compostos 1 e 2 frente às cepas de *Salmonella* spp.

Microrganismos (n)	Composto 1			Composto 2			Cloranfenicol		
	CIM µg/mL			CIM µg/mL			CIM µg/MI		
	Variação	CIM50	CIM90	Variação	CIM50	CIM90	Variação	CIM50	CIM90
S. Enteritidis (34)	62,5	62,5	62,5	125	125	125	4	4	4
S. Braenderup (8)	62,5	62,5	62,5	125	125	125	4	4	4
S. Worthington(5)	62,5	62,5	62,5	125	125	125	4	4	4
S. Infantis (3)	62,5	62,5	62,5	62,5-125	62,5	125	4	4	4
ATCC 13076 (1)	62,5	62,5	62,5	125	125	125	4	4	4
ATCC 14028 (1)	62,5	62,5	62,5	125	125	125	4	4	4
Salmonella spp(52)	62,5	62,5	62,5	62,5-125	125	125	4	4	4

(n): Número de microrganismos testados. CIM 50: Concentração Inibitória Mínima em 50% das cepas. CIM 90: Concentração Inibitória Mínima em 90% das cepas.

Em pesquisas anteriores, também foram encontrados resultados semelhantes de compostos pirazolínicos e pirazólicos halogenados. Desai *et al.*, 2012 avaliaram a atividade antimicrobiana de 2-(5-(3-(4-fluorfenil)-1-fenil-1*H*-pirazol-4-il)-3-(aril)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-il)tiazol-4(5*H*)-onas contra bactérias Gram-negativas, e obtiveram CIM de 50 µg/mL contra *E. coli*. Miniyar, Barmade & Mahajan, 2015 testaram o composto 1-(5-(2-cloroquinolin-3-il)-3-(4-fluorfenil)-1*H*-pirazol-1-il)etanona contra *E. coli* e obtiveram CIM de 93 µg/mL. Derivados de pirazolininas 1,3,5-tri-substituídas foram testadas frente *E. coli* por Mehta *et al.*, 2015, onde o melhor resultado foi do complexo com flúor substituído na posição *para*. Além disso, Patel *et al.*, 2016 avaliaram a ação do composto 5-etil-2-{2-[4-(3-(2,4-difluorfenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-5-il)fenoxi]etil}piridina também contra *E. coli* e obtiveram CIM de 125 µg/mL.

A atividade antimicrobiana encontrada para o composto 1 e as demais citadas na literatura, são explicadas pela presença de átomos de flúor nas moléculas, o que promove um aumento significativo da atividade biológica devido às propriedades intrínsecas do flúor, como pequeno raio atômico, baixa polaridade da ligação C-F, alta eletronegatividade e estabilidade (Haga *et al.*, 1984; Joshi *et al.*, 1990; Desai *et al.*, 2012; Mehta *et al.*, 2015). A alta eletronegatividade do flúor pode acentuar a eletrofilicidade dos grupos vizinhos na molécula e a substituição de um grupo metil por um grupo trifluormetil, resulta em um acréscimo de lipofilicidade. Esta lipofilicidade proporciona uma maior permeabilidade nas

membranas celulares e facilita a absorção e transporte dessas moléculas dentro do sistema biológico, melhorando as propriedades farmacocinéticas das drogas (Martins *et al.*, 2006; Bonacorso *et al.*, 2011).

O cloridrato de 5-(4-bromofenil)-3-(2-hidroxifenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (2), inibiu 50% e 90% das cepas de *Salmonella* spp. na concentração 125 µg/mL. Trabalhos anteriores também mostram a ação antimicrobiana de compostos bromo-substituídos, como apresentado por Oliveira *et al.*, 2014, onde os derivados de 5-(2-bromofenil)-3-fenil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida apresentaram CIM e CFM de 31,2 a 250 µg/mL para cepas de leveduras do gênero *Candida*. Miniyar, Barmade & Mahajan, 2015 testando compostos 1-(3-(4-bromofenil)-5-(2-coroquinolin-3-il)-1*H*-pirazol-1-il)etanona, contra *E. coli* obtiveram CIM de 77 µg/mL. Também Sharshira & Hamada, 2012 avaliaram a ação de compostos 3-metil-4-fenil-5-(*p*-bromofenil)-1-(*p*-sulfamilfenil)pirazol frente *S. aureus* e obtiveram CIM de 63 g/mL e frente *C. albicans* CIM de 125 g/mL. Portanto, compostos bromo-substituídos também apresentam importante atividade antimicrobiana frente diversos microrganismos, pois assim como o flúor estes átomos apresentam lipofilicidade (Oliveira *et al.*, 2014).

Sobre o potencial de redução em logaritmos, definido pela contagem de UFC, ambos compostos foram eficazes nas concentrações testadas, que foram definidas de acordo com a CIM. O composto 1 na menor concentração testada 62,5 µg/mL reduziu 6,6 log₁₀ UFC frente *S. Worthington* e na maior concentração testada 250 µg/mL houve redução de até 7,7 log₁₀ UFC para *S. Braenderup*, 9,7 log₁₀ UFC para *S. Enteritidis*, 9,8 log₁₀ UFC para *S. Worthington*, 11 log₁₀ UFC para *S. Infantis*, 9 log₁₀ UFC para *S. Enteritidis* ATCC 13076 e 8,2 log₁₀ UFC para *S. Typhimurium* ATCC 14028, comparados com o log₁₀ dos controles (Figura 4A).

Já o composto 2 nas mesmas concentrações comparado aos controles reduziu 6,2 log₁₀ UFC, 5,3 log₁₀ UFC, 5,4 log₁₀ UFC, 5,4 log₁₀ UFC, 6,3 log₁₀ UFC e 8 log₁₀ UFC para os mesmos microrganismos respectivamente (Figura 4B), mostrando mais uma vez, o maior potencial do composto 1. Com relação à atividade bactericida, ambos compostos foram bacteriostáticos nas concentrações testadas.

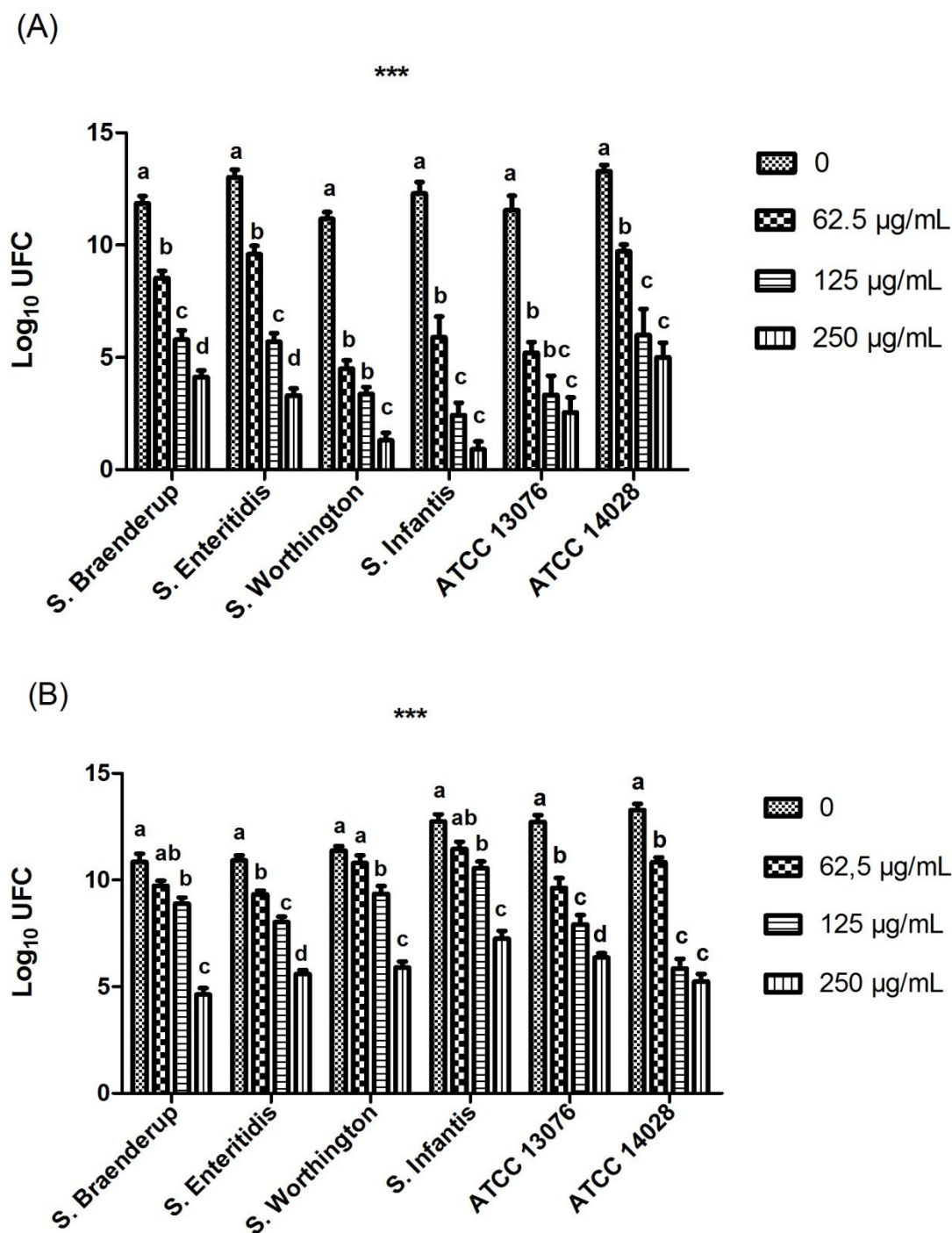


Fig. 4. Quantificação de células viáveis em \log_{10} UFC das cepas de *Salmonella* spp. tratadas com diferentes concentrações do composto 1 (A) e do composto 2 (B), por meio da ANOVA e pós-teste de Tukey. *** ($p < 0,05$) indica diferença significativa. Letras diferentes em cada concentração representam diferença significativa entre estas pelo teste de média ($p < 0,05$).

Na formação de biofilmes por *Salmonella* spp. as células foram quantificadas por meio da contagem de UFC. Todas as concentrações dos compostos 1 e 2 (definidas de

acordo com a CIM obtida) apresentaram percentual de redução comparado aos controles não tratados, sendo então eficazes na redução de biofilmes. O composto 1 na menor concentração testada 62,5 µg/mL foi capaz de reduzir 34% da formação de biofilmes, observada frente *S. Worthington*. Em 250 µg/mL reduziu 30% frente *S. Braenderup*, 58% para *S. Enteritidis*, 45% frente *S. Worthington*, 48% para *S. Infantis*, 30% para *S. Enteritidis* ATCC 13076 e 31% frente *S. Typhimurium* ATCC 14028 (Figura 5A). O composto 2 na mesma concentração para os mesmos microrganismos, reduziu a formação de biofilmes em 57%, 47%, 56%, 57%, 43% e 49% respectivamente (Figura 5B). Apesar de ambos apresentarem porcentagens próximas, nota-se que o composto 2 mostrou melhor resultado na redução da formação de biofilmes de *Salmonella* do que o composto 1, o que pode ser devido a maior polaridade dos átomos de Bromo, que possivelmente atuaram na desconstrução da matriz extracelular secretada no processo de formação dos biofilmes, permitindo uma fácil permeabilidade deste composto a estas células fortemente aderidas.

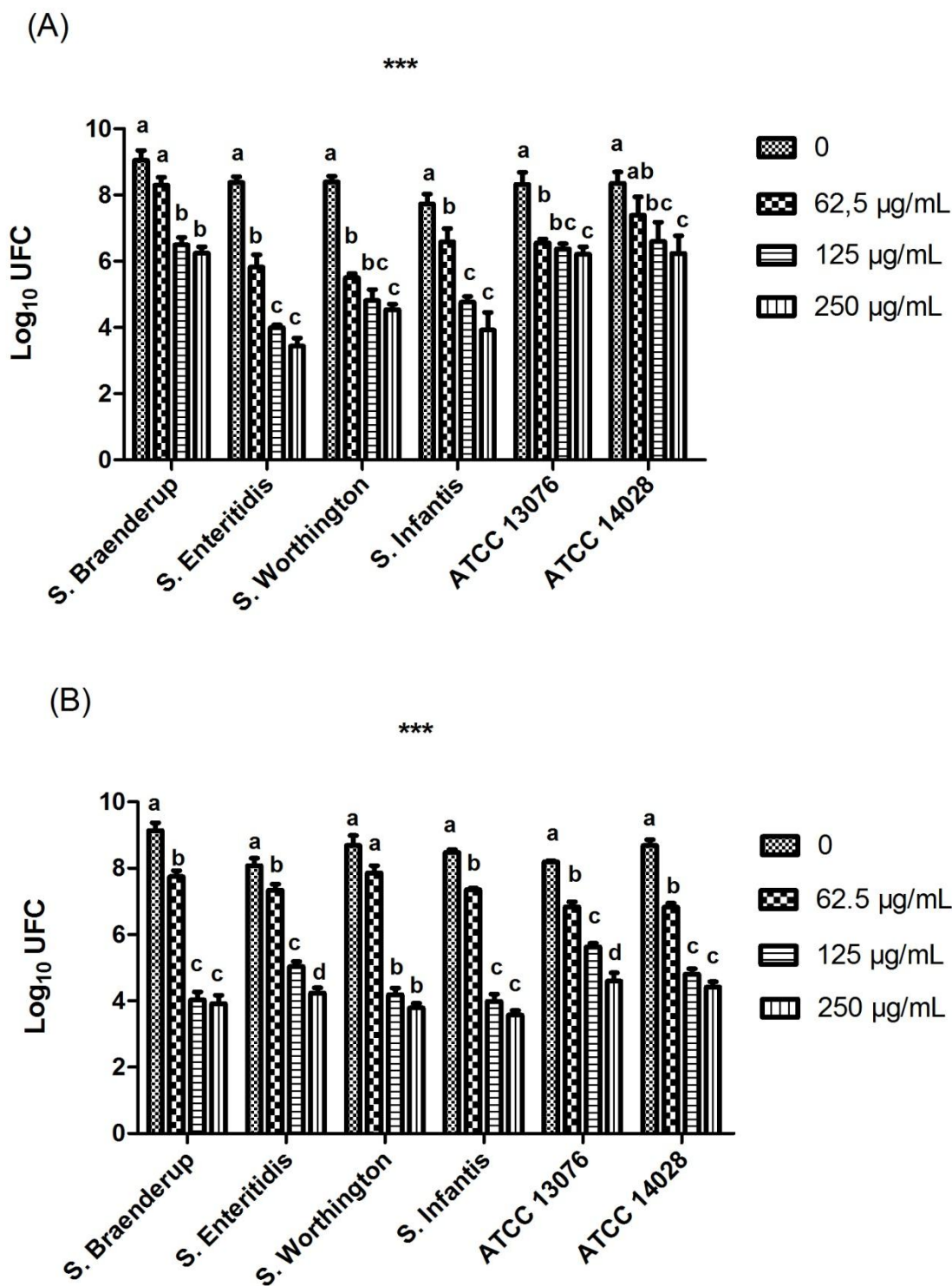


Fig. 5. Atividade do composto 1 (A) e do composto 2 (B) na formação de biofilmes de *Salmonella* spp. por meio da ANOVA e pós-teste de Tukey. *** ($p < 0,05$) indica diferença significativa. Letras diferentes em cada concentração representam diferença significativa entre estas pelo teste de media ($p < 0,05$).

Alguns trabalhos já retrataram a atividade antibiofilme de compostos com núcleos pirazolínicos como no desenvolvido por Cascioferro *et al.*, 2016 onde derivados de N-fenil-1H-pirazol-4-carboxamidas com átomos de flúor, foram eficazes na redução de biofilmes de *S. aureus*. Singh *et al.*, 2014 também encontraram atividade antibiofilme de conjugados de 1,3,5-triazina-pirazol frente *S. aureus*, onde mais uma vez compostos fluorados foram eficazes. Na pesquisa de Suresh *et al.*, 2017 foi descoberta uma atividade antibiofilme potente para derivados de pirazol-pirimido[4,5-d]pirimidina, contra bactérias Gram-positivas. Apesar disso, existem poucos trabalhos com compostos pirazolínicos e seus derivados avaliando a formação de biofilmes, principalmente frente *Salmonella* spp. o que mostra a importância da contribuição de nossa pesquisa.

O ensaio de citotoxicidade dos compostos foi realizado de acordo com o percentual de viabilidade celular com base na redução de MTS com as linhagens de células HeLa (tumorais) e Vero (não tumorais) e as concentrações testadas foram definidas de acordo com a CIM obtida (Tabela 2).

Tabela 2: Percentual de viabilidade celular das linhagens HeLa e Vero tratadas com diferentes concentrações dos compostos 1 e 2.

Concentração µg/mL	Composto 1				Composto 2			
	HeLa		Vero		HeLa		Vero	
	Med/DP	VC%	Med/DP	VC%	Med/DP	VC%	Med/DP	VC%
500	1,36 ± 0,17	100	1,32 ± 0,03	100	0,09 ± 0,00	8,26	0,10 ± 0,00	7,59
150	1,4 ± 0,09	100	1,37 ± 0,10	100	0,09 ± 0,01	8,38	0,09 ± 0,00	7,26
15	1,36 ± 0,12	100	1,40 ± 0,00	100	0,26 ± 0,02	23,42	0,24 ± 0,00	19,23

Med/DP: Média e Desvio Padrão. VC (%): Viabilidade Celular em porcentagem.

O composto 1 não apresentou citotoxicidade para as linhagens de células tumorais e não tumorais, apresentando alto percentual de viabilidade celular nas concentrações testadas. No entanto, o composto 2 apresentou citotoxicidade em todas as concentrações frente às duas linhagens de células, com baixa viabilidade celular.

Resultado semelhante foi encontrado por Altintop *et al.*, 2015 onde o composto com p-bromofenil, derivado de tiazolil-pirazolinas, apresentou alta citotoxicidade contra a linhagem A549 de células de adenocarcinoma de pulmão humano e, ainda outros derivados de 2-[5-(4-fluorfenil)-3-(5-cloro/metiltiofen-2-il)-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-feniltiazol

apresentaram baixa citotoxicidade contra as linhagens A549 e 3T3/NIH (células embrionárias de fibroblastos de ratos). Estes dados mostram que os núcleos pirazolínicos não aparentam ter citotoxicidade, no entanto, é visível que há uma alteração desta atividade quando o bromo é incluído como substituinte.

Por não apresentar nenhum potencial citotóxico, o composto 1 foi submetido ao teste de Ames para avaliar a mutagenicidade (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade mutagênica do composto 1 com a linhagem TA100 de *S. Typhimurium* expresso pela média de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM) com (S9+) e sem (S9-) ativação metabólica.

Tratamento ($\mu\text{g/placa}$)	<i>Salmonella Typhimurium</i> TA 100	
	S9 -	S9 +
0.0 ^a	109 \pm 12	96 \pm 7
15	116 \pm 8 (1,0)	167 \pm 49 (1,7)
150	141 \pm 10 (1,2)*	161 \pm 45 (1,7)
500	101 \pm 1 (0,9)	122 \pm 24 (1,2)
C+	1.432 ^b \pm 1	98 ^c \pm 1

^aControle negativo: DMSO. (C+) Controle positivo: ^bazida sódica (2,5 $\mu\text{g/placa}$). ^c2-aminoantraceno (1,5 $\mu\text{g/placa}$). * $p < 0.05$ (ANOVA).

O composto 1 não apresentou mutagenicidade para a linhagem TA100 de *Salmonella Typhimurium* nas concentrações testadas (500, 150 e 15 $\mu\text{g/placa}$), visto que o índice de mutagenicidade (IM) foi < 2 . Para que a amostra seja mutagênica o IM precisa ser ≥ 2 ou seja, o número de colônias revertentes da amostra precisa ser o dobro ou mais que o número de revertentes do controle positivo. Em um trabalho anterior, realizado por Altintop *et al.*, 2015 onde investigaram a atividade mutagênica de compostos derivados de tiazolil-pirazolinas frente a linhagem TA100 de *S. Typhimurium*, nenhum potencial mutagênico foi detectado para os compostos 2-[5-(4-fluorfenil)-3-(5-metiltiofen-2-il)-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-cianofenil)tiazol flúor-substituídos.

Com este estudo, vimos que os dois novos cloridratos de 4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboximidamidas testados (1 e 2) são compostos promissores pelas atividades biológicas mostradas, sendo que o composto 3-(2-hidroxifenil)-5-(4-(trifluormetil)fenil)-4,5-diidro-1H-

pirazol-1-carboximidamida (1) apresentou melhor atividade antimicrobiana, potencial redução em logaritmos e na formação de biofilmes por isolados de *Salmonella* spp. e nenhum potencial citotóxico e mutagênico em diferentes concentrações testadas.

Na busca constante por novas drogas que sejam capazes de controlar a ação de microrganismos patogênicos, estes compostos podem ser alternativas de tratamento e uso para desinfecção, atuando como agentes sanificantes na indústria de alimentos. Porém, é necessário o desenvolvimento de estudos *in vivo* que confirmem esse potencial e anulem qualquer possibilidade de danos para a saúde humana.

Agradecimentos

Apoio financeiro: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul).

Referências

Altıntop, M. D., Ozdemir, A., Turan-Zitouni, G., Ilgin, S., Atl, O., Demirel, R., Kaplancikli, Z. A. (2015). A novel series of thiazolyl-pyrazoline derivatives: Synthesis and evaluation of antifungal activity, cytotoxicity and genotoxicity. *Eur J Med Chem* **92**, 342-352.

Bonacorso, H. G., Porte, L. M. F., Navarini, J., Paim, G. R., Luz, F. M., Oliveira, L. M., Whietan, C. W., Martins, M. A. P., Zanatta, N. (2011). Chemoselective fluorination of 2-hydroxy-3,4,7,8-tetrahydro-2H-chromen-5(6H)-ones using DAST. *Tetrahedron Lett* **52**, 3333-3335.

Capoci, I. R. G., Bonfim-Mendonça, P. S., Arita, G. S., Pereira, R. R. A., Consolaro, M. E. L., Bruschi, M. L., Negri, M., Svidzinski, T. I. E. (2014). Propolis Is an Efficient Fungicide and Inhibitor of Biofilm Production by Vaginal *Candida albicans*. *Evid-Based Compl alt*, 1-9.

Cascioferro, S., Maggio, B., Raffa, D., Raimondi, M. V., Cusimano, M. G., Schillaci, D., Manachini, B., Plescia, F., Daidone, G. (2016). Synthesis and biofilm formation reduction of pyrazole-4-carboxamide derivatives in some *Staphylococcus aureus* strains. *Eur J Med Chem* **123**, 58-68.

Castelijns, G. A. A., Parabirsing, J. A., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., Abee, T. (2013). Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* and *S. Infantis*. *Vet Microbiol* **161**, 305-314.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M7-A9 “Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically”; approved standard, 9. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, **2012**.

Corrêa, F. E. L., Dantas, F. G. S., Grisolia, A. B., Crispim, B. A., Oliveira, K. M. P. (2014). Identification of class 1 and 2 integrons from clinical and environmental *Salmonella* isolates. *J Infect Dev Ctries* **8**, 1518-1524.

Costa, E. M., Silva, S., Madureira, A. R., Cardelle-Cobas, A., Tavaría, F. K., Pintado, M. M. (2014). A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism’s biofilm formation *in vitro*. *Carbohydr Polym* **101**, 1081-1086.

Desai, N. C., Joshi, V. V., Rajpara K. M., Vaghani, H. V., Satodiya, H. M. (2012). Facile synthesis of novel fluorine containing pyrazole based thiazole derivatives and evaluation of antimicrobial activity. *J Fluorine Chem* **142**, 67-78.

Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol* **31**, 173-180.

Flach, J., Karnopp, C., Corção, G. (2005). Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Sci Vet* **33**, 291-296.

Grant, A., Hashem, F., Parveen, S. (2016). *Salmonella* and *Campylobacter*: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. *Food Microbiol* **53**, 104-109.

Guo, C., Hoekstra, R. M., Schroeder, C. M., Pires, S. M., Ong, K. L., Hartnett, E., Naugle, A., Harman, J., Bennett, P., Cieslak, P., Scallan, E., Rose, B., Holt, K. G., Kissler, B., Mbandi, E., Roodsari, R., Angulo, F. J., Cole, D. (2011). Application of Bayesian techniques to model the burden of human salmonellosis attributed to U.S. food commodities at the point of processing: adaptation of a Danish model. *Foodborne Pathog Dis* **8**, 509-516.

Haga, T., Fujikawa, K., Koyanag, T., Nakajima, T., Hayashi, K. (1984). Some New 2-Substituted 5-Trifluoromethylpyridines. *Heterocycles* **22**, 117-124.

Harding, A. P., Popelier, P. L. A., Harvey, J., Giddings, A., Foster, G., Kranz, M. (2015). Evaluation of aromatic amines with different purities and different solvent vehicles in the Ames test. *Regul Toxicol Pharm* **71**, 244-250.

Jamwal, A., Javed, A., Bhardwaj, V. (2013). A review on Pyrazole derivatives of pharmacological potential. *J Pharmaceut Bio* **3**, 114-123.

Joshi, J., Sharma, S., Guruprasad, K.N. (2014). Foliar application of pyraclostrobin fungicide enhances the growth, rhizobial-nodule formation and nitrogenase activity in soybean (var. JS-335). *Pestic Biochem Phys* **114**, 61-66.

Kado, N. Y., Langley, D., Eisenstadt, E. (1983). A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat Res* **121**, 25-32.

Marques, S. C., Rezende, J. G. O. S., Alves, L. A. F., Silva, B. C., Alves, E., Abreu, L. R., Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz J Microbiol* **38**, 538-543.

Martins, M. A. P., Pereira, C. M. P., Moura, S., Fiss, G. F., Frizzo, C. P., Emmerich, D. J., Zanatta, N., Bonacorso, H. G. (2006). Preparation of novel 5-alkoxy-1,1,1,2,2-pentafluoroalk-4-en-3-ones and their application to a one-pot synthesis of azoles. *Arquivoc xiii*, 187-194.

Mehta, J. V., Gajera, S. B., Thakor, P., Thakkar, V. R., & Patel, M. N. (2015). Synthesis of 1,3,5-trisubstituted pyrazoline derivatives and their applications. *RSC Adv* **5**, 85350–85362.

Miniyar, P. B., Barmade, M. A., Mahajan, A. A. (2015). Synthesis and biological evaluation of 1-(5-(2-chloroquinolin-3-yl)-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl)ethanone derivatives as potential antimicrobial agents. *J Saudi Chem Soc* **19**, 655-660.

Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res-Fund Mol M* **455**, 29-60.

Netto, A. V. G., Frem, R. C. G., Mauro, A. E. (2008), A química supramolecular de complexos pirazólicos. *Quím Nova* **31**, 1208-1217.

Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K., Baba, E. (2001) Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis* **45**, 61-69.

Oliveira, S., Pizzuti, L., Quina, F., Flores, A., Lund, R., Lencina, C., Pacheco, B. S., Pereira, C. M. P., Piva, E. (2014). Anti-*Candida*, Anti-Enzyme Activity and Cytotoxicity of 3,5-Diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboximidamides. *Molecules* **19**, 5806-5820.

Panzenhagen, P. H. N., Aguiar, W. S., Frasão, B. S., Pereira, V. L. A., Abreu, D. L. C., Rodrigues, D. P., Nascimento, E. R., Aquino, M. H. C. (2016). Prevalence and fluorquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Control* **61**, 243-247.

Papavasileiou, K., Papavasileiou, E., Tseleni-Kotsovili, A., Bersimis, S., Nicolaou, C., Ioannidis, A., Chatzipanagiotou, S. (2010). Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella* enterica strains isolated from children with gastroenteritis. *Eur J Clin Microbiol* **29**, 1401-1405.

Patel, N. B., Shaikh, F. M., Patel, H. R., Rajani, D. (2016). Synthesis of 2-pyrazolines from pyridine based chalcone by conventional and microwave techniques: Their comparison and antimicrobial studies. *J Saudi Chem Soc* **20**, 451-456.

Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., Anderson, G. D., Burton, E. G., Cogburn, J. N., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert, K., Veenhuizen, A. W., Zhang, Y. Y., Isakson, P. C. (1997). Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). *J Med Chem* **40**, 1347-1365.

Ribeiro, A. R., Kellermann, A., Santos L. R., Bessa, M. C., Nascimento, V. P. (2007). *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Braz J Microbiol* **38**, 296-299.

Rogero, S. O., Lugao, A. B., Ikeda, T. I., Cruz, A. S. (2003) Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mater Res* **6**, 317-320.

Sánchez, M. X., Fluckey, W. M., Brashears, M. M., Mckee, S. R. (2002). Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broilers processed in air-chilled and immersion-chilled environments. *J Food Protect* **65**, 948-956.

Santos, E. F. S., Cury, N. M., Nascimento, T. A., Raminelli, C., Casagrande, G. A., Pereira, C. M. P., Simionatto, E., Yunes, J. A., Pizzuti, L. (2017). Ultrasound Promoted Synthesis of 3-(Thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboximidamides and Anticancer Activity Evaluation in Leukemia Cell Lines. *J Braz Chem Soc* **28**, 217-224.

Sharshira, E. M., Hamada, N. M. M. (2012). Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Pyrazole Derivatives. *Molecules* **17**, 4962-4971.

Shi, X., Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Tech* **20**, 407-413.

Singh, B., Bhat, H. R., Kumawat, M. K., Singh, U. P. (2014). Structure-guided discovery of 1,3,5-triazine–pyrazole conjugates as antibacterial and antibiofilm agent against pathogens causing human diseases with favorable metabolic fate. *Bioorg Med Chem Lett* **24**, 3321–3325.

Suresh, L., Kumar, P. S. V., Poornachandra, Y., Kumar, C. G., Chandramouli, G. V. P. (2017). Design, synthesis and evaluation of novel pyrazolo-pyrimido[4,5-d]pyrimidine derivatives as potent antibacterial and biofilm inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **27**, 1451–1457.

Tejs, S. (2008). The Ames test: a methodological short review. *Stud Environ Sci* **4**, 7-14.

Valeriano, C., Oliveira, T. L. C., Carvalho, S. M., Cardoso, M. G., Alves, E., Piccoli, R. H. (2012). The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control* **25**, 673-677.

Vicentini, C. B., Ramacciato, J. C., Teixeira, R. G., Groppo, F. C., Motta, R. H. L. (2013). Comparative effect of sodium dipyrone and sodium dipyrone associated to caffeine to control post-tooth extraction pain. *Rev Dor* **14**, 174-178.

6. CONCLUSÃO GERAL

A investigação das atividades antimicrobiana, antibiofilme, citotóxica e mutagênica de dois novos cloridratos de 4,5-diidro-1*H*-pirazol-carboximidamidas, revelou o potencial destes compostos frente *Salmonella* spp. e mostrou que o cloridrato de 3-(2-hidroxifenil)-5-(4-(trifluormetil)fenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (1) foi o mais promissor pois não apresentou citotoxicidade nem mutagenicidade e uma potencial atividade antimicrobiana e antibiofilme. Porém, ambos compostos (1 e 2) podem ser alternativas para o controle destes microrganismos patogênicos, principalmente na indústria de alimentos do setor avícola, atuando como agentes sanificantes. Estudos *in vivo* ainda são necessários, para que possa ser comprovada a eficácia destes compostos sem que existam riscos de danos à saúde humana.

7. ANEXOS

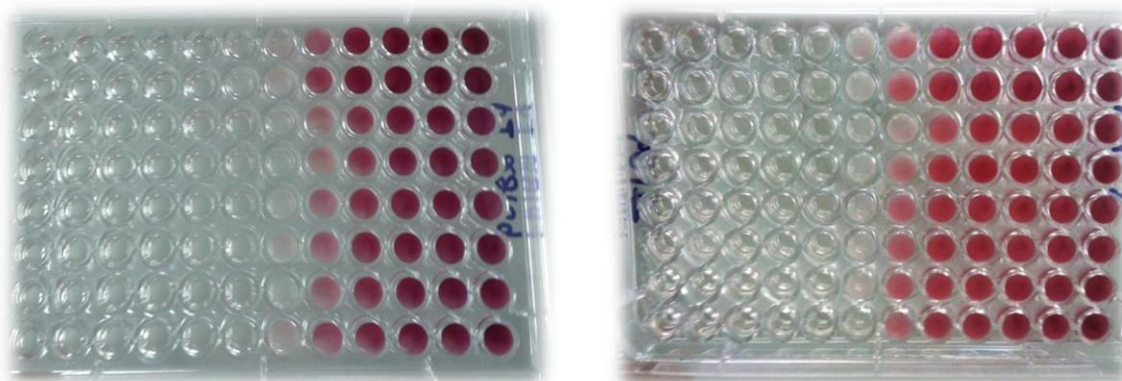


Figura 6 - Leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos 1 e 2 frente *Salmonella* spp. **Fonte:** Autor.

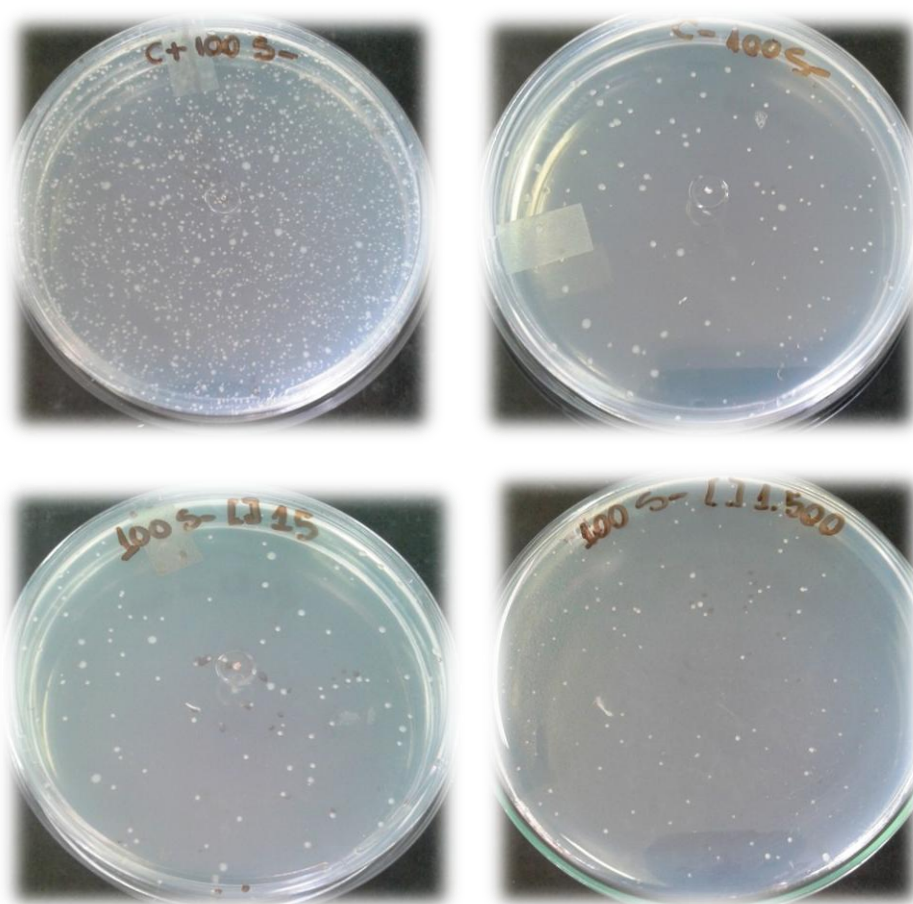


Figura 7 - Teste de Ames método de micro-suspensão Kado com o composto 1.

Fonte: Autor.