

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA, EM pH ÁCIDO, DE COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DO CANFENO EM *Mycobacterium tuberculosis*

Tamires Leite Valverde, Hayalla Côrrea de Carvalho, Mariana Regina Passos de Souza, Fábio Vandresen, Vanessa Pietrowski Baldin, Regiane Bertin de Lima Scodro (co-orientadora), Rosilene Fressatti Cardoso (orientadora), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Microbiologia / Microbiologia aplicada

Palavras-chave: Tuberculose, tiossemicarbazona, pH ácido

Resumo:

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de compostos sintéticos derivados do canfeno, em pH ácido, com a metodologia *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) contra cepa referência *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos multifármacos resistentes de *M. tuberculosis*. Das 16 substâncias derivadas do canfeno testadas, três obtiveram redução significativa na CIM, sendo estas a Tiossemicarbazida (**4**), 4-dimetilamino-benzaldeído-tiossemicarbazona (**5d**) e 3-flúor-benzaldeído-tiossemicarbazona (**5j**) com valores de 62 µg/mL para 7,8 µg/mL, >250 µg/mL para 15,6 µg/mL e >250 µg/mL para 7,8 µg/mL, respectivamente. Nesse sentido, estes compostos podem ter ação melhorada quando em pH ácido. Estudos adicionais são necessários para avaliar melhor a estabilidade e toxicidade destes compostos.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A forma pulmonar é mais frequente e epidemiologicamente importante, uma vez que a transmissão do agente causador da doença ocorre por via respiratória. Estima-se que a incidência da TB em 2015, foi de 10,4 milhões de casos em todo o mundo (OMS, 2016). A pirazinamida (PZA), que é um dos fármacos preconizado para o tratamento da TB, possui uma melhor atividade em pH ácido. No interior dos macrófagos, onde o bacilo se multiplica em uma fase do desenvolvimento da doença, o pH é ácido (5,5) e isso favorece a ação da PZA que entra passivamente no bacilo e é convertida em ácido pirazinóico. Este composto biologicamente ativo atua por inativar enzimas essenciais para a sobrevivência da bactéria (ARBEX et al., 2010). O canfeno pode ser

encontrado em uma grande quantidade de óleos essenciais e tem sido muito estudado por seu potencial de atividade antimicrobiana (GONÇALVES et al., 2005). Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi determinar a concentração inibitória mínima, em pH ácido, de tiossemicarbonas sintéticas derivadas do canfeno contra cepa referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos de *M. tuberculosis* multifármacos resistentes (MDR).

Materiais e métodos

A concentração inibitória mínima (CIM) para a cepa padrão H₃₇Rv (ATCC 27294) e 16 isolados clínicos utilizados nesta pesquisa, foi determinada em triplicata com o método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) (PALOMINO et al., 2002), utilizando-se a resazurina como agente revelador em microplacas de 96 poços. Nas cavidades laterais da microplaca, foi adicionado 200 µL de água destilada para a manutenção da umidade. Na coluna 11, foi colocado apenas 200 µL do meio Middlebrook 7H9 pH 6,0; como um controle de esterilidade do meio de cultura, e nas outras cavidades foram adicionados 100 µL do meio. A coluna 10 foi considerada como um controle de crescimento do inóculo bacteriano. Cada composto foi colocado a partir da coluna 2 e diluição seriada na razão 2 foi realizada até a coluna 9. As concentrações dos compostos variaram de 250 a 1,95 µg/mL. A PZA, fármaco controle do ensaio, foi diluída da mesma forma, obtendo-se concentrações de 1.600 a 12,5 µg/mL. Após, 100 µL do inóculo bacteriano, padronizado de acordo com a escala 1 de McFarland e diluído 1:20, foi acrescentado a todas as cavidades, com exceção da coluna 11. A placa foi fechada com tampa de acrílico e incubada por sete dias a 35 °C. Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL da solução de resazurina a 0,02 % recentemente preparada a cada cavidade da placa, e esta foi incubada por mais 24 horas a 35 °C. A mudança da cor da resazurina de azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido) indicou crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como a menor concentração do composto/fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Resultados e Discussão

Foram testadas 16 tiossemicarbonas derivadas do (-)-canfeno (Tabela 1). Três destas, apresentaram redução da CIM com valor maior que três diluições, em meio de cultura pH 6,0; quando comparada com a CIM obtida em meio com pH 6,8. Estas foram: Tiossemicarbazida (**4**), com redução da CIM de 62 µg/mL para 7,8 µg/mL, 4-dimetilamino-benzaldeído-tiossemicarbazona (**5d**), com redução da CIM de >250 µg/mL para 15,6 µg/mL e 3-fluor-benzaldeído-tiossemicarbazona (**5j**), com redução da CIM de >250 µg/mL para 7,8 µg/mL. Estas três substâncias derivadas do (-)-canfeno foram selecionadas para serem testadas contra cinco isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR (Tabela 2).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) de tiossemicarbazonas derivadas do (-)-canfeno em meio de cultura com pH 6,8 e pH 6,0, contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

Número	Composto	CIM (µg/mL) pH 6,8*	CIM (µg/mL) pH 6,0
1	(-) canfeno	> 250	> 250
3	Isotiocianato derivado do (-)-canfeno	250	> 250
4	Tiossemicarbazida derivado do (-)-canfeno	62,5	7,8
5a	Acetofenona-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	62,5	15,6
5b	Benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	15,6	7,8
5c	4-metoxi-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	15,6	7,8
5d	4-dimetilamino-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	> 250	15,6
5f	4-hidroxi-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	15,6	7,8
5h	4-trifluorometil-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	> 250	> 250
5i	2-fluor-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	> 250	> 250
5j	3-fluor-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	> 250	7,8
5l	4-fluor-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	> 250	> 250
5m	4-bromo-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	> 250	> 250
5n	4-nitro-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	> 250	> 250
5p	2-cloro-benzaldeído-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	> 250	> 250
8	Isatina-tiossemicarbazona derivado do (-)-canfeno	15,6	31,25

* Resultados encontrados em estudos prévios pelo nosso laboratório.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Tiossemicarbazida (**4**), 4-dimetilamino-benzaldeído-tiossemicarbazona (**5d**) e 3-fluor-benzaldeído-tiossemicarbazona (**5j**), em pH ácido (6,0), contra isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* multifármacos resistentes (MDR)

Isolados	CIM (4) (µg/mL)	CIM (5d) (µg/mL)	CIM (5j) (µg/mL)
49	3,9	7,8	7,8
109	3,9	7,8	7,8
3614	3,9	15,6	7,8
64A	3,9	7,8	7,8
73A	7,8	3,9	7,8

Comparando os resultados obtidos em nosso estudo com outros prévios, observamos valores de CIM em pH 6,0 bem inferiores aos relatados. As CIMs das substâncias (**4**) passou para 7,8 µg/mL, da (**5d**) para 15,6 µg/mL e da (**5j**) para 7,8 µg/mL. Isto nos mostra uma considerável melhora da ação das substâncias em pH 6,0 como também observado com PZA. As

outras 13 substâncias derivadas do (-)-canfeno testadas não apresentaram diferença tecnicamente significativa nos valores de CIM contra a cepa de referência nas duas diferentes condições de pH.

As CIMs das substâncias **(4)**, **(5d)** e **(5j)** foi determinada em cinco isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR (49, 109, 3614, 64A e 73A). Estas substâncias apresentaram valores de CIMs que variaram de 3,9 a 15,6 µg/mL, valores estes que se assemelham ao da cepa de referência que é pansusceptível.

Conclusões

Das dezesseis tiossemicarbazonas derivadas do canfeno, a substância **4** apresentava atividade contra *M. tuberculosis* e ainda teve sua CIM reduzida mostrando melhor atividade em pH 6,0 como observado com PZA. As duas outras substâncias derivadas do canfeno apresentaram atividade contra *M. tuberculosis* apenas em pH 6,0 (substâncias **5d** e **5j**). Considerando que o estudo abrangeu um número limitado de isolados clínicos, estudos adicionais são necessários para complementar estes achados e em futuro implementar pesquisas no sentido de determinar o mecanismo de ação dessas substâncias.

Agradecimentos

Ao CNPq e Fundação Araucária.

Referências

ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.; SIQUEIRA, H.R.; MELLO, F.A. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos, e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 2010; 36(5): 626-640.

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A.A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto de Biologia**. 2005; 72(3): 353-358.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 2002; 46(8): 2720-2722.

WHO. **Global tuberculosis report**. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 18 de Abril de 2017.