

Atividade citotóxica e anti-*Mycobacterium tuberculosis* de uma série de tiadiazóis derivados do (-)-canfeno

Larise Kimberly Almeida Castro (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Giovana Ferreira Costacurta, Vanessa Pietrowski Baldin, Eloísa Gibin Sampiron, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Rosilene Fressati Cardoso, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br

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

Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: tuberculose, REMA, MTT

Resumo:

A tuberculose está entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo por doença infecciosa. O surgimento de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente aos fármacos de primeira linha trouxe grandes dificuldades no tratamento da doença. Deste modo, as pesquisas de novas substâncias podem servir como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade anti-*M. tuberculosis* e citotóxica de tiadiazóis derivados do (-)-canfeno. Para a avaliação da atividade anti-*M. tuberculosis* utilizou-se o ensaio de microdiluição em caldo utilizando resazurina (*Resazurin Microtiter Assay Plate-REMA*) e para determinação da citotoxicidade o ensaio colorimétrico com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio) em células VERO. O resultado da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias testadas foram: **(6a)** 7,8 µg/mL, **(6b)**, **(6d)**, **(6i)**, **(6k)** e **(6m)** 15,6 µg/mL, **(6o)** 62,5 µg/mL, **(6g)** 125 µg/mL, **(6n)** 250 µg/mL e **(6e)**, **(6f)**, **(6j)**, **(6h)** e **(6l)** 250 µg/mL. As substâncias com as menores CIM foram selecionadas para o ensaio de citotoxicidade. O índice de seletividade (IS) das substâncias **(6b)**, **(6k)** e **(6m)** variaram de 12,00 a 15,78. Estas substâncias apresentaram ótima atividade anti-*M. tuberculosis* e novos estudos devem ser realizados para dar continuidade ao planejamento de novas substâncias com perfil terapêutico adequado.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que permanece um importante problema de saúde pública no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (MA, et al., 2010). Nas últimas décadas, dois grandes desafios impactaram as reconhecidas dificuldades de controle da

TB: a pandemia de HIV/AIDS e a emergência da TB multirresistente (TB/MDR) aos fármacos.

Visto a crescente resistência de *M. tuberculosis* frente ao tratamento existente, se faz necessária a busca por novos fármacos, visando alternativas principalmente aos pacientes que possuem TB-MDR, em razão disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*M. tuberculosis* e citotoxicidade em células VERO, de tiadiazóis derivados do (-)-canfeno.

Materiais e métodos

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As substâncias sintetizadas foram gentilmente cedidas pela mestra Mariana R. P. de Souza, orientanda do Professor Dr. Fabio Vandresen da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR, Londrina).

Foi realizado o ensaio de REMA (*Resazurin Microtiter Assay Plate*) descrito por Palomino et al. (2002). Brevemente, foram adicionados 100 µL do meio, e acrescentou-se 100 µL da solução das substâncias na concentração de 1000 µg/mL, e a partir dela foi realizada uma diluição 1: 2. O crescimento bacteriano foi padronizado e então se inoculou 100 µL de crescimento bacteriano. Foi adicionado o fármaco padrão isoniazida (INH) (SIGMA-ALDRICH®) para o controle do ensaio. As placas foram seladas e incubadas a 37 °C. Após sete dias de incubação, foram adicionados 30 µL de solução de resazurina a 0,01% e as placas foram incubadas por 24 horas. A mudança de coloração azul para rósea indicou o crescimento de bactérias. A CIM foi definida como a menor concentração de substância, capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para o ensaio foi utilizada a cepa referência de *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294.

Ensaio de Citotoxicidade em Células VERO pelo Método de Redução do MTT

O ensaio foi realizado utilizando células epiteliais VERO (ATCC CCL81). O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços, nas quais adicionou-se 5 x 10⁴ células/poço e DMEM suplementado com 10 % de SFB, a placa foi então incubada por 24 horas a 37 °C, sob tensão de 5 % de CO₂. Após, o meio de cultura foi aspirado e acrescentado as substâncias a serem testadas nas concentrações de 500 µg/mL a 7,6 µg/mL. Após incubação e lavagem foi acrescentado 50 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio) (AMRESCO®), na concentração de 2 mg/mL. A microplaca foi incubada protegida da luz por 4 horas. Após, o MTT foi retirado e adicionou-se 150 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) (AMRESCO®), em todos os poços. A leitura foi realizada com o auxílio de um leitor de ELISA (ASYS EXPERT PLUS), em comprimento de onda de 550 nm.

Resultados e Discussão

Tabela: Atividade *anti-Mycobacterium tuberculosis* e citotoxicidade de 1,3,4 tiadiazóis derivados do (-)-canfeno

n°	Nome químico	CIM µg/mL	CIM µM	IC ₅₀ µg/mL	IS
(1)	(-)-canfeno	>250	>1835,13	NR	NR
(3)	Isotiocianato derivado do (-)-canfeno	250	1279,95	NR	NR
(4)	Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno	62,5	274,88	99,33	1,6
(6a)	benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	7,8	25,04	161,66	20,72
(6b)	4-fluor-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	15,6	47,21	180	11,53
(6c)	4-cloro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	15,6	47,21	182,5	11,69
(6d)	2-cloro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	> 250	720,68	NR	NR
(6e)	4-bromo-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	> 250	638,83	NR	NR
(6f)	4-metil-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	125	383,09	NR	NR
(6g)	4-nitro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	> 250	699,45	NR	NR
(6h)	3-nitro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	15,6	43,64	NR	NR
(6i)	2-nitro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	> 250	699,45	NR	NR
(6j)	4-dimetilamino-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	15,6	43,88	206,67	13,78
(6k)	4-trifluormetil-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	> 250	657,09	NR	NR
(6l)	2-hidroxi-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	15,6	47,61	236,67	15,78
(6m)	4-tercetil-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	250	678,31	NR	NR
(6n)	4-metoxi-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol derivado do (-)-canfeno	62,5	182,93	87,5	1,41

(IC₅₀): concentração citotóxica para 50 % das células; NR-não realizado.

A substância **(6a)**, que é um tiadiazol acrescido de um benzaldeído, foi a que apresentou o melhor resultado da CIM (7,8 µg/mL), demonstrando que a formação do anel do tiadiazol com a adição do benzaldeído sem a presença de ligantes ao anel benzênico aumentou consideravelmente a atividade anti-*M. tuberculosis*. Na substância **(6b)** foi acrescentado um átomo de fluor ao benzaldeído na posição *para* e o resultado da CIM foi de 15,6 µg/mL. As substâncias **(6c)** e **(6d)** tem como radical um átomo de cloro, nas posições *para* e *orto*, respectivamente. Essa mudança de posição do radical ocasionou uma grande diferença no valor da CIM, de CIM > 250 µg/mL **(6d)** para CIM de 15,6 µg/ml **(6c)**. As substâncias **(6g)**, **(6h)** e **(6i)** possuem como radical uma molécula de nitrato (NO₃) nas posições *para*, *meta* e *orto*, respectivamente, e quando comparado as CIM, nota-se que a substância **(6h)** (CIM 15,6 µg/mL), obteve melhor resultado em comparação às outras duas (> 250 µg/mL). Diante disso, é possível afirmar que não apenas o radical interfere na atividade contra *M. tuberculosis*, mas também a posição na qual se encontra esse radical ligado ao benzaldeído. Dentre o grupo de substâncias com substituintes retiradores de elétrons as melhores CIM obtidas (15,6 µg/mL) foram das substâncias **(6b)** e **(6c)**. Os grupos que

apresentavam radicais doadores de elétrons, as CIMs variaram de 15,6 µg/ml a > 250 µg/mL. As CIM das substâncias (6a), (6b), (6c), (6h), (6k), (6m) e (6n) apresentaram valores que podem ser comparados com os fármacos de segunda linha para o tratamento da TB, como tobramicina (CIM: 4,0-8,0 µg/mL), claritromicina (CIM: 8,0-16,0 µg/mL) e cicloserina (CIM: 12,5-50 µg/mL). Através do ensaio de citotoxicidade, obteve-se o IS que representa o quão seletiva é uma substância ao micro-organismo e não às células. As substâncias que apresentaram valores promissores foram (6a) IS 20,72 (6b) IS 11,53, (6c) IS 11,69 (6j) IS 13,78 e (6l) IS 15,78 (tabela).

Conclusões

Até o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de tiadiazóis derivados do (-)-canfeno frente a *M. tuberculosis*. Os ligantes dos 1,3,4 tiadiazol derivados do (-)-canfeno mais ativos frente ao bacilo da TB foram o (6a), (6b), (6c), (6h), (6j), (6l). Estudos posteriores devem ser realizados utilizando isolados clínicos TB/MDR e XDR, para o melhor entendimento do papel destes ligantes na bactéria, bem como outros para o planejamento de novas substâncias com perfil terapêutico adequado.

Agradecimentos

À Fundação Araucária.

Referências

DALCOMO, M.P. Tratamento da Tuberculose Sensível e Resistente. **Revista Pulmão**, v.21, n. 1, p. 55-59, 2012.

JAIN, A.K.; SHARMA, S.; VAIDYA, A.; RAVICHANDRAN, V.; AGRAWAL, R.K. 1,3,4-Thiadiazole and its Derivatives: A Review on Recent Progress in Biological Activities. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 5, p. 557–576, 2013.

MA, Z.; LIENHARDT, C.; MCLLERON, H.; NUNN, A.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancetv**, v. 375, n. 9731, p. 2100-2109, 2010.

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*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Report 2016**. Disponível em <http://who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 15 jul. 2017.