

ESTUDO DA ATIVIDADE DE HIDRAZONAS E ACILHIDRAZONAS EM *Mycobacterium tuberculosis*

Gabrielle Vaz da Silva (PIBIC/CNPq/AF/UEM), Eloísa Gibin Sampiron (PCS/UEM), Giovana Ferreira Costacurta (PCS/UEM), Vanessa Guimarães Alves Olher (IFPR), Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli (PBF/UEM), Rosilene Fressatti Cardoso (PCS/PBF/UEM), Vera Lucia Dias Siqueira (PCS/PBF/UEM), Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br.

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

Área e subárea: Microbiologia - Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: tuberculose, hidrazonas, acilhidrazonas

Resumo:

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, e tem como esquema de tratamento, o uso de quatro fármacos, sendo eles isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Apesar da eficácia do tratamento, esses medicamentos podem causar diversos efeitos colaterais e interações medicamentosas. Hidrazonas, que são bases de Schiff, e acilhidrazonas têm sido relatadas como potentes agentes antimicobacteriano e antibacteriano com potencial promissor ao tratamento da tuberculose. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial anti-*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), *in vitro*, de hidrazonas e acilhidrazonas em pH neutro e ácido. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das hidrazonas e acilhidrazonas, utilizou-se o método *resazurin microtiter assay plate* (REMA), no qual se utiliza a resazurina como indicador da viabilidade celular. Para isso, as substâncias de interesse foram incubadas por sete dias com a cepa padrão de *Mtb* H₃₇Rv. Após isso, foi adicionada resazurina e a placa foi reincubada por 24 h. A CIM foi o ponto onde não houve crescimento visível da bactéria testada. Das sete substâncias testadas nesse estudo, três apresentaram atividade significativa frente a *Mtb*, com CIM variando de 0,97 a >250 µg/mL. Apenas as hidrazonas HC-3 e HA-5 não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano nas concentrações testadas. Além disso, os melhores resultados foram encontrados para as substâncias AHC-4 e ACHCOI-17, tanto em pH neutro quanto no pH ácido, sendo consideradas substâncias muito promissoras para o tratamento da doença. Novos estudos devem ser realizados para o melhor entendimento da atividade anti-*Mtb* dessas substâncias.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa de caráter crônico, causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), cuja descoberta perfaz mais de um século desde sua identificação pelo pesquisador Robert Koch (CHAI et al., 2018). Embora muitas pesquisas tenham sido feitas a fim de erradicar esta doença, atualmente esse patógeno continua sendo um problema para saúde pública. Em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou 10,4 milhões de novos casos de tuberculose, incluindo 600 mil casos resistentes à rifampicina e 490 mil casos multirresistentes (WHO, 2017). A TB continua sendo uma das doenças com maior índice de mortalidade dentre as doenças infectocontagiosas. Cerca de um terço da população mundial tem contato com o bacilo, que é transmitido através da fala, espirro ou tosse, sendo disseminada de forma aérea (WHO, 2017). Diferente de outras bactérias patogênicas que secretam várias toxinas, a TB causa uma inflamação aguda devido a inúmeros danos tissulares, tendendo à uma cronicidade (CHAI et al., 2018). O tratamento da tuberculose é feito, atualmente, utilizando-se quatro fármacos: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB). No entanto, apesar da grande eficácia do tratamento, esses medicamentos podem causar diversos efeitos adversos e/ou interações medicamentosas. Devido às altas taxas de abandono do tratamento, à recidiva pelos pacientes e ao problema de saúde pública que a doença apresenta, é necessário buscar novas substâncias para que o tratamento da tuberculose seja mais curto e eficaz. Hidrazonas têm sido relatadas como potentes agentes antimicobacteriano, antibacteriano e antifúngico (TIAGO et al., 2017). Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial anti-*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), *in vitro*, de hidrazonas e acilhidrazonas em pH neutro e ácido.

Materiais e métodos

Preparo das substâncias

As hidrazonas (HC-3, HA-5 e H4OHBEN-7) e acilhidrazonas (ACHA-6, ACHC-4 e ACHCOI) foram sintetizadas e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Vanessa Guimarães Alves Olher, docente do Instituto Federal do Paraná. Todas as substâncias foram diluídas em dimetilsulfóxido e mantidas em uma concentração de 10.000 µg/mL. Os fármacos de referência (INH e PZA), utilizados como controle para validação do experimento, foram mantidos em uma solução estoque de 400 µg/mL e 12.800 µg/mL, respectivamente.

Determinação da CIM

A CIM das substâncias testadas foi realizada pelo método *resazurin microtiter assay plate* (REMA), incubando-se as substâncias de interesse com o bacilo em microplacas de 96 poços, no qual se utiliza a resazurina

como indicador da viabilidade celular (PALOMINO et al., 2002). A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv foi cultivada em meio middlebrook 7H9 suplementado com ácido oleico, dextrose e catalase (OADC), por 15 a 21 dias a 37° C e então ajustada em água destilada estéril utilizando-se a escala 1 de McFarland. Esse inóculo padronizado e diluído 1:20 foi adicionado na placa de 96 poços, na qual foram feitas as diluições seriadas das hidrazonas e acilhidrazonas (250 – 0,97 µg/mL) em meio 7H9-OADC. Esse ensaio foi incubado por sete dias a 37° C. Após esse período de incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina em cada poço da placa. Incubou-se novamente o ensaio por 24 h a 37 °C. A CIM foi o ponto onde não houve crescimento visível da bactéria testada.

Para os teste em pH neutro, a INH foi utilizada como controle. Já para os testes em pH ácido, a substância utilizada como controle, foi a PZA e o meio de cultura 7H9 foi previamente preparado seguindo as mesmas instruções, e seu pH ajustado em 6,0. Os outros procedimentos para pH ácido foram realizados da mesma maneira como descrito anteriormente.

Resultados e Discussão

Nossos estudos demonstraram que dentre as sete substâncias testadas em pH neutro (6,8), três substâncias apresentaram excelente atividade anti-*Mtb*. A hidrazona H4OHBEN-7, apresentou CIM equivalente a 31,25 µg/mL (Tabela 1). As hidrazonas HC-3 e HA-5 tiveram CIM > 250 µg/mL. Substâncias com CIM maior que 250 µg/mL não são bons candidatos a fármacos anti-TB, visto que seriam necessárias concentrações muito altas para inibir o crescimento bacteriano, o que pode acarretar um aumento da citotoxicidade e efeitos adversos ao paciente.

Tabela 1: Atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de hidrazonas e acilhidrazonas em pH neutro e ácido.

Abreviação	Nome químico	CIM µg/mL pH neutro	CIM µg/mL pH ácido
HC-3	(1E,2E)-3-fenilacrilaldeído hidrazona	> 250	> 250
HA-5	4-metoxibenzaldeído hidrazona	> 250	> 250
H4OHBEN-7	4-hidroxibenzaldeído hidrazona	31,25	31,25
ACHA-6	N'-[(1E)-(4-metoxifenil)metileno]benzohidrazida	250	125
ACHC-4	N'-[(1E, 2E)-3-fenilprop-2-en-1-ilideno]benzohidrazida	15,6	3,9
ACH4OHB-8	N'-[(1E)-(4-hidroxifenil)metileno]benzohidrazida	125	62,5
ACHCOI-17	N'-[(1E, 2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ilideno]isonicotinohidrazida	0,97	0,97

CIM: Concentração inibitória mínima

As CIMs para as acilhidrazonas ACHC-4, ACHA-6, ACH4OHB-8 e ACHCOI-17 testadas foram: 15,6 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 0,97 µg/mL, respectivamente. Em pH ácido (6,0), as CIMs para as substâncias HC-3 e HA-5, H4OHBEN-7, ACHCOI-17 não tiveram nenhuma alteração com a mudança de pH. Já as substâncias ACHA-6 e ACH4OHB-8 variaram somente uma diluição de CIM. Por outro lado, a acilhidrazona ACHC-4 teve a maior alteração de CIM com a alteração de pH, variando de 15,6 µg/mL para 3,9 µg/mL.

Conclusões

Das sete substâncias testadas nesse estudo, três apresentaram atividade significativa frente a *Mtb*, sendo os melhores resultados encontrados para as substâncias ACHC-4 e ACHCOI-17, tanto em pH neutro quanto no pH ácido, sendo consideradas substâncias muito promissoras para o tratamento da doença. Novos estudos devem ser realizados para o melhor entendimento da atividade anti-*Mtb* dessas substâncias.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa concedida, à orientadora Prof^a. Dr^a. Regiane Bertin de Lima Scodro e a equipe do laboratório de Bacteriologia Médica/DAB/UEM, os quais foram muito importantes para a realização deste projeto.

Referências

CHAI, Q.; ZHANG, Y.; LIU, C. H. *Mycobacterium tuberculosis*: An Adaptable Pathogen Associated With Multiple Human Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 158, 2018.

PALOMINO, J. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

TIAGO, F. S. **Descrição teórica de complexos de metais de transição com ligantes hidrazona com potencial aplicação farmacológica**. Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de Brasília, Instituto de Química, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report**. França, 2017. Disponível em:
<http://www.who.int/tb/publications/global_report/MainText_13Nov2017.pdf>.
Acesso em: 26 jul. 2018.