

ATIVIDADE ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* DE TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DO (-)-CANFENO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* COM PIRAZINAMIDA

Andressa Miyuki Takeshiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Vanessa Pietrowski Baldin, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Vera Lucia Dias Siqueira, Rosilene Fressatti Cardoso, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: miyukiandressa@gmail.com

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

Ciências Biológicas III – Microbiologia – Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Tuberculose, (-)-canfeno, pirazinamida

Resumo:

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa que atinge principalmente os pulmões, podendo também atingir outras partes do corpo. Frente ao aumento dos isolados resistentes aos fármacos utilizados na terapia, tem-se a necessidade em novas moléculas que possam ser ativas frente ao bacilo. Diante disso, produtos naturais vêm despertando o interesse científico ao longo dos anos, entre eles o (-)-canfeno, um monoterpene bicíclico encontrado no óleo essencial de diversas espécies de plantas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) de três tiossemicarbazonas derivadas do (-)-canfeno (**4a**, **6a** e **6b**) em pH 6,0; a atividade dessas substâncias em meio de cultura com diferentes condições de crescimento (com 4 % de albumina de soro bovino e 10 % de soro fetal bovino), todos pelo método *Resazurin Microtiter Assay Plate*, bem como o sinergismo associando essas tiossemicarbazonas com pirazinamida utilizando o método *checkerboard*. Os resultados mostraram que essas substâncias possuem atividade anti-*Mtb* quando analisadas em pH ácido, bem como coloca a substância **6b** como potencial candidato a fármaco anti-TB.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma patologia infectocontagiosa que causa danos principalmente nos pulmões. O tratamento atual, devido a longa duração e diversos efeitos colaterais, resulta em baixa aderência ao tratamento (BRASIL, 2010) levando ao aumento da seleção de isolados clínicos multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e tendo-se a necessidade urgente para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos anti-TB. Nesse sentido, muitos são os estudos que demonstram atividade antimicobacteriana de terpenóides de plantas. Dentre estes, o (-)-

canfeno é um monoterpeneo bicíclico encontrado no óleo essencial de diversas espécies de plantas, tais como no crisântemo e no alecrim (SOUZA et al., 2018). Diante do conhecimento da TB e da necessidade do desenvolvimento de novas preparações farmacêuticas para o tratamento, a proposta do presente trabalho é ampliar os estudos de tiossemicarbazonas derivadas do (-)-canfeno que já se mostraram promissoras em estudos prévios (SOUZA et al., 2018) e determinar suas atividades anti-*Mtb* em diferentes condições de crescimento, bem como avaliar a ação combinatória dessas substâncias com a pirazinamida (PZA).

Materiais e métodos

Determinação in vitro da atividade em Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv em diferentes condições de crescimento

A síntese das tiossemicarbazonas derivadas do (-)-canfeno foram realizadas seguindo a metodologia descrita na literatura (SOUZA et al., 2018). A atividade anti-*Mtb* foi determinada frente à cepa de referência *Mtb* H₃₇Rv pelo método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) de acordo com Palomino et al. (2002). Inicialmente, as substâncias testadas (**4a**, **6a** e **6b**) foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas seriadamente em meio de cultura 7H9 enriquecido com ácido oleico, dextrose, albumina e catalase (OADC) nas concentrações de 250 a 0,97 µg/mL. A solução do fármaco padrão isoniazida foi preparada em água deionizada estéril seguido de diluições em meio de cultura. Tanto *Mtb* H₃₇Rv quanto os isolados clínicos *Mtb* resistentes à PZA foram cultivados em Middlebrook 7H9-OADC a 37 °C por 15-21 dias, diluídas e acrescentados 100 µL em cada orifício da placa em concentração final 1,5×10⁶ UFC/mL. Após este período, as placas foram reveladas com solução de resazurina 0,02 %, reincubadas e realizado leitura visual após 24 h. Seguindo a mesma metodologia, os testes foram estendidos para outras condições de crescimento, sendo 7H9 acrescido com 4 % de albumina de soro bovino (ASB) e com 10 % de soro fetal bovino (SFB).

Avaliação da atividade anti-M. tuberculosis da combinação com pirazinamida

O teste para avaliar a ação combinatória entre os fármacos **4a**, **6a** e **6b** com PZA foi realizado pelo método *resazurin drug combination microtiter* (REDCA) de acordo com Caleffi-Ferracioli et al. (2013). Para tal, a cepa de referência e os isolado clínicos testados foram semeados em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, incubados por 15-21 dias a 37 °C e o inóculo padronizado de acordo com a escala McFarland 1 e diluída 1:20 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, resultando assim em uma concentração bacteriana de 1,5×10⁶ UFC/mL. As microplacas foram seladas e incubadas a 37 °C em atmosfera normal por sete dias. Após esse período, solução de resazurina (0,02 %) foi adicionado e as placas foram reincubadas

nas mesmas condições para posterior leitura visual. O efeito sinérgico foi avaliado calculando o Índice da Fração Inibitória, sendo que os efeitos das combinações dos agentes antimicrobianos foram classificados em: sinérgico ($IFI \leq 0,5$), aditivo ou indiferente ($IFI > 0,5$ e < 4) e antagônico ($IFI > 4$).

Resultados e Discussão

Nesse estudo, substâncias foram submetidas a ensaios *in vitro* para verificar a atividade das mesmas em pH ácido. Os resultados mostraram que as três substâncias foram ativas nessa condição (Tabela 1). No geral, foi observado atividade promissora com variação na CIM de 3,9 a 7,8 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa H₃₇Rv em pH 6,1, sendo comparáveis a atividade em pH 6,8 que apresentaram CIM de 7,8 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$ (SOUZA et al., 2018). A maior variação de valor de CIM foi para a substância **6a** que apresentou melhor atividade quando em pH ácido (3,9 $\mu\text{g/mL}$) quando comparada com os achados de Souza et al. (2018) que verificaram CIM 15,6 $\mu\text{g/mL}$ em pH neutro. Também verificamos a atividade dessas substâncias em isolados clínicos PZA resistentes, sendo **4a** e **6b** as que mostraram melhor atividade com valores de CIM variando entre 3,9 e 7,8 $\mu\text{g/mL}$ para todos os três isolados testados, exceto a substância **4a** que para o isolado 71a apresentou CIM 15,6 $\mu\text{g/mL}$. Já a substância **6b** teve menor atividade para os três isolados testados quando em pH ácido (31,2 $\mu\text{g/mL}$). Nos ensaios realizados com meio acrescido de ASB, a CIM variou de 7,8 a 31,25 e no meio acrescido de SFB foi de 7,8 a 31,2 (Tabela 1). A ASB tem como composição apenas albumina e o SFB além da albumina contém proteínas totais, alfa, β e γ globulinas, glicose, uréia, creatinina e hemoglobulina.

Na determinação da ação combinatória dessas substâncias com PZA, para a cepa padrão H₃₇Rv foi observado sinergismo de **4a** e **6a** quando combinados com PZA, enquanto que a substância **6b** foi indiferente (Tabela 1). Apesar de em nenhum isolado clínico ser observado sinergismo, em nenhum dos ensaios as substâncias se mostraram antagônicas quando combinadas a PZA.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) de tiossemicarbazonas derivadas do (-)-canfeno e a interação sinérgica com pirazinamida

n°	CIM $\mu\text{g/mL}$ pH ácido										FICI pH ácido		
	4a		6a		6b		PZA						
	pH 6,1	4% ASB	10% SFB	pH 6,1	4% ASB	10% SFB	pH 6,1	4% ASB	10% SFB	pH 6,1	4a/ PZA	6a/ PZA	6b/ PZA
H ₃₇ Rv	7,8	7,8	31,2	3,9	7,8	7,8	7,8	31,2	15,6	100	0,5	0,5	0,75
109 ^R	7,8	na	na	3,9	na	na	31,2	na	na	>800	n.a	n.a	n.a
71A ^R	15,6	na	na	7,8	na	na	31,2	na	na	3.200	2	1	1
3614 ^R	7,8	na	na	3,9	na	na	31,2	na	na	3.200	1	2	0,75

R: resistente; n.a: não analisado; **FICI**: Índice da Fração Inibitória; 4 % ASB: meio de cultura 7H9 acrescido de 4 % de albumina de soro bovino; 10 % SFB: meio de cultura 7H9 acrescido de 10 % de soro fetal bovino; PZA: pirazinamida.

A atividade dessas moléculas pode estar relacionada com a alta lipofilicidade, uma vez que a parede celular micobacteriana apresenta alto teor de lipídios, o que corrobora com Maccarri et al. (2005) que observou, dentre diferentes substâncias testadas, as melhores atividades em compostos altamente lipofílicos.

Conclusões

As tiosemicarbazonas derivadas do (-)-canfeno mostraram atividade em pH ácido, tanto na cepa padrão H₃₇Rv quanto aos isolados resistentes a PZA. No entanto, nos meios acrescidos com a ASB e SFB não obtiveram relevância significativa frente aos isentos desses componentes. Pode-se também observar que a associação entre **4a** e **6a** com PZA apresentou sinergismo (FICI 0,5), enquanto a **6b** foi classificado como indiferente. Com isso, amplia-se a possibilidade no desenvolvimento de novas preparações terapêuticas no tratamento da tuberculose, sendo necessário mais estudo a fim de elucidar melhor o mecanismo dessas moléculas no bacilo.

Agradecimentos

A UEM pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e ao Laboratório da Bacteriologia Médica pelo apoio na execução do trabalho.

Referências

CALEFFI-FERRACIOLI K. R., et al. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660–663, 2013.

MACCARI R., et al. *In vitro* advanced antimycobacterial screening of isoniazid-related hydrazones, hydrazides and cyanoboranes: part 14. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 2509–2513, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**, 2010. p. 47. Disponível em: <http://www.itarget.com.br/newclients/sppt.org.br/2010/extra/download/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf>. Acesso em: 23 ago. 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.

SOUZA M. R. P., et al. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Natural Product Research**, v. 24, p. 1–6, 2018.