

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- *Mycobacterium tuberculosis* DE TIADIAZÓIS DERIVADOS DO (-)-CANFENO EM pH ÁCIDO E SUA COMBINAÇÃO COM PIRAZINAMIDA

Larise Kimberly de Almeida (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Giovana Ferreira Costacurta, Eloísa Gibin Sampiron, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Rosilene Fressatti Cardoso, Vera Lucia Dias Siqueira, 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, REDCA

Resumo:

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa conhecida há séculos, que até os dias de hoje é considerada um importante problema de saúde pública. Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de sensibilidade do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* frente a uma série de tiadiazóis derivados do (-)-canfeno em pH ácido, e sua combinação com o fármaco pirazinamida (PZA). Para isto, foi realizado o ensaio de REMA (*resazurin microtiter assay plate*) com o objetivo de se obter a CIM das substâncias, e após, foi realizado o ensaio de REDCA (*resazurin drugs combination microtiter assay*), testando a combinação dos tiadiazóis derivados do (-)-canfeno com a PZA. As substâncias **(6a)**, **(6b)**, **(6c)**, **(6f)**, **(6h)** e **(6j)** obtiveram resultados favoráveis de CIM contra o bacilo, sendo respectivamente CIM de 7,8 µg/mL, 15,6 µg/mL, 7,8 µg/mL, 62,5 µg/mL, 7,8 µg/mL e 7,8 µg/mL. Dentre estes, as substâncias **(6a)**, **(6b)**, **(6c)** e **(6j)** foram testadas em combinação com a PZA, e as substâncias **(6a)**, **(6b)**, **(6c)** mostraram uma ação aditiva ou indiferente, enquanto a **(6j)** demonstrou efeito sinérgico com a PZA. Portanto, essas substâncias são promissoras por conseguirem ter atividade contra o bacilo causador da tuberculose também em pH ácido, e, quando associado não interferir ou até mesmo melhorar a atividade da PZA, que é o fármaco padrão que age contra o bacilo em pH ácido.

Introdução

A tuberculose é uma doença contagiosa muito antiga, que ainda hoje permanece como um problema de saúde mundial, principalmente nos países em desenvolvimento (MA et al., 2010). O principal agente causador da tuberculose é o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, e sua transmissão ocorre através de gotículas de saliva, produzidas através da tosse, espirro ou fala

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Estima-se que em 2016 ocorreram 10,4 milhões de casos novos de tuberculose, e 1,7 milhões de mortes no mundo. No Brasil, ocorreram 87 mil casos novos e 7,3 mil mortes (WHO, 2017).

Quando o indivíduo é exposto ao bacilo, esse penetra pelas vias aéreas e atinge os alvéolos, onde são fagocitados pelos macrófagos, e uma grande parte dos bacilos permanece viva e se multiplica dentro dessas células. No ambiente intramacrofágico, o bacilo sofre ação do pH ácido e de enzimas, no entanto, geralmente consegue persistir, mesmo com a sua atividade metabólica diminuída (LOPES et al., 2006). A pirazinamida (PZA) é o único fármaco padrão que age em *M. tuberculosis* exatamente nessas condições, onde sua atividade metabólica é baixa, e também em pH ácido (HATFULL et al., 2014). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação *in vitro* de uma série de tiadiazóis derivados do (-)-canfeno frente a *M. tuberculosis* em pH ácido, assim como a combinação destes com a PZA.

Materiais e métodos

Tiadiazóis derivados do (-)-canfeno

A série de tiadiazóis derivados do (-)-canfeno foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Fabio Vandresen da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR, campus Londrina).

Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)

Para o ensaio de REMA (*resazurin microtiter assay plate*) foi utilizado a cepa padrão de referência H₃₇Rv (ATCC 27294), com crescimento entre 15 e 21 dias, padronizada na escala 1 de McFarland e diluída 1:20 em meio 7H9 acidificado (pH 6,0) suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase). Foi utilizada uma placa de 96 poços, onde foram acrescentados 100 µL do meio nas colunas 2 até 11, e depois foi adicionado 100 µL das substâncias no primeiro poço da coluna 2, e realizado uma diluição seriada até a coluna 10, obtendo concentrações de 250 a 0,97 µg/mL. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL da diluição bacteriana em todos os poços, menos no controle negativo. Ao final, adicionou-se 200 µL de água destilada estéril nas colunas 1 e 12, e foi incubada em estufa a 37 °C por sete dias. Ao final dos sete dias foi adicionado 30 µL de resazurina a 0,01 % em todos os poços, e a placa foi incubada novamente. A leitura foi realizada após 24 horas, e a CIM foi considerada como o último poço onde não houve mudança de cor da resazurina. A PZA foi utilizada como controle.

Avaliação da combinação dos tiadiazóis e PZA contra M. tuberculosis

Para o ensaio de REDCA (*resazurin drugs combination microtiter assay*) utilizou-se uma diluição bacteriana preparada igualmente ao REMA, e na placa de 96 poços também foram adicionados 100 µL de meio 7H9

acidificado (pH 6,0) em todos os poços da coluna 2 a 11. Foi então adicionado 100 µL PZA em todos os poços da coluna 11 e então realizado uma diluição seriada até a coluna 3. Após este procedimento, foram acrescentados 100 µL da substância em toda fileira A e realizada diluição seriada até a fileira G. Foram adicionados 100 µL da diluição bacteriana em todos os poços. A placa foi incubada e revelada nas mesmas condições do ensaio de REMA. O resultado qualitativo foi obtido através do cálculo do ICIF (Índice de concentração inibitória fracionada), sendo que um valor $\leq 0,5$ é considerado como sinérgico (S), entre $>0,5$ e < 4 é considerado aditivo ou indiferente (A/I), e ≥ 4 é antagônico (AN).

Resultados e Discussão

Estudos realizados anteriormente demonstraram que alguns tiadiazóis possuíam atividade frente a *M. tuberculosis* em pH normal, por isso eles foram testados também em pH ácido para saber se continuariam ou não tendo ação. Os resultados de CIM obtidos da série de tiadiazóis variaram entre 3,9 a ≥ 250 µg/mL, vistos na tabela 1. Sendo que, quatro tiadiazóis com melhores CIM foram testados em ação combinatória com a PZA.

Tabela 1. CIM e ICIF da série de tiadiazóis derivados do (-)-canfeno em pH ácido e combinado com a PZA.

Nº	Substância	CIM (µg/mL)	REDCA (PZA)	
			ICIF	Classificação
(6a)	Benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	7,8	1	A/I
(6b)	4-fluor-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	15,6	1	A/I
(6c)	4-cloro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	7,8	1	A/I
(6d)	2-cloro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	250	NR	NR
(6e)	4-bromo-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	>250	NR	NR
(6f)	4-metil-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	62,5	NR	NR
(6g)	4-nitro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	>250	NR	NR
(6h)	3-nitro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	7,8	NR	NR
(6i)	2-nitro-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	>250	NR	NR
(6j)	4-dimetilamino-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	7,8	0,375	S
(6k)	4-trifluormetil-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	>250	NR	NR
(6l)	4-tercbutil-benzaldeído-1,3,4-tiadiazol	250	NR	NR

CIM: Concentração inibitória mínima. REDCA: *resazurin drugs combination microtiter assay*. PZA: pirazinamida. A/I: aditivo ou indiferente. S: sinérgico. NR: não realizado

As substâncias (6a), (6b), (6c), (6f), (6h) e (6j) obtiveram bons resultados de inibição do bacilo em pH ácido, sendo suas CIM de 7,8 µg/mL, 15,6 µg/mL, 7,8 µg/mL, 62,5 µg/mL, 7,8 µg/mL e 7,8 µg/mL, respectivamente. Demonstrando que mesmo com a acidificação do meio, as substâncias conseguem agir, suas CIM foram mais baixas inclusive que o próprio fármaco de referência que age em pH ácido, a pirazinamida (CIM de 100 µg/mL).

Tendo em vista a ação em pH ácido, as substâncias (6a), (6b), (6c) e (6j) foram testadas em combinação com a pirazinamida, e como resultado obteve-se que a substância (6j) possui sinergismo com o fármaco, ou seja, quando usados combinadamente, um melhora a ação do outro contra *M. tuberculosis*. Tal resultado obtido foi importante, tendo em vista que o tratamento da tuberculose é realizado através de poliquimioterapia e é importante que não haja antagonismo entre os fármacos utilizados. As outras substâncias se mostraram aditivas ou indiferentes, elas não interferem na ação do fármaco, nem o fármaco interfere na ação das substâncias.

Conclusões

Com este trabalho foi demonstrado que os tiadiazóis derivados do (-)-canfeno são substâncias promissoras, pois possuem ótima atividade em pH ácido contra *M. tuberculosis*. Quando associadas ao fármaco padrão, a maioria das substâncias teve efeito aditivo com a PZA, e, no caso da substância (6j) apresentou sinergismo, melhorando sua atividade e a atividade da PZA nos bacilos. Estudos complementares são necessários para melhor entender a atividade dessas substâncias e também o seu mecanismo de ação.

Agradecimentos

À Fundação Araucária e a todos do laboratório de Bacteriologia Médica.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde 2014. **Secretária de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/741-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/11481-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

HATFULL, G. F.; JACOBS, W. R. **Molecular Genetics of *Mycobacterium***. 12 ed. United States of America, 2014.

LOPES, A. J.; JANSEN, J. M.; CAPONE, D. Patogenia e Imunologia. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, UERJ. v.5, n.2, 2006

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Report 2017**. Disponível em <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259366/9789241565516-eng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 19 jul. 2018.