

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO LAPACHOL EM pH ÁCIDO E A SUA COMBINAÇÃO COM PIRAZINAMIDA FRENTE À *Mycobacterium tuberculosis*

Caroline de Melo Machado Andrade (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lincoln Luís Silva, Andressa Lorena Ieque, Julia Macente, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Rosilene Fressatti 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, combinações de drogas, lapachol

Resumo:

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa cujo tratamento recomendado consiste no uso de isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (PZA). O recente aumento de isolados clínicos multirresistentes e a pouca oferta de fármacos resultaram na busca urgente por novas substâncias para o tratamento. Nesse sentido, o presente estudo avaliou a atividade, *in vitro*, do lapachol em pH ácido e da sua combinação com a pirazinamida frente a *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇R_v) por meio do ensaio de REMA (*resazurin microtiter assay plate*) e *checkerboard* para determinar a CIM (concentração inibitória mínima) e o sinergismo de fármacos, respectivamente. O lapachol apresenta CIM de 31,25 µg/mL em pH neutro, diminuindo para 7,8 µg/mL em pH 6,0, o que faz com que apresente uma concentração quase 13 vezes menor se comparado à PZA em pH ácido. A CIM do lapachol diminui para 3,9 µg/mL quando associado à PZA em pH 6,0, demonstrando o efeito aditivo desta associação. Sendo assim, o lapachol tem potencial para ser utilizado no tratamento da tuberculose por também apresentar atividade em pH ácido como a PZA, único fármaco anti-TB que atua no microambiente ácido (intramacrofágico), e apresentar CIM menor que o fármaco padrão. Novos estudos dessa substância devem ser realizados para avançar no conhecimento desta substância no mecanismo de ação frente ao bacilo da tuberculose.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa conhecida há séculos e quase foi erradicada em países desenvolvidos. Mas em 2014, cerca de 9,6 milhões de pessoas adoeceram, 1,5 milhões morreram e aproximadamente 480.000 desenvolveram a forma multirresistente da doença. O tratamento recomendado consiste no uso de INH, RIF, EMB e

PZA (WHO, 2016). Em especial, a PZA atua no microambiente ácido do macrófago (pH 5,5) e mata pelo menos 95% dos bacilos logo no início do tratamento (HEIFETS, 1992). Porém, situações como monoterapia e/ou falta de adesão do paciente podem levar ao surgimento de microrganismos resistentes a um ou mais fármacos. O recente aumento de isolados clínicos multirresistentes alertou pela urgente necessidade da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antituberculose. Um exemplo disso é o lapachol, uma substância extraída de *Tabebuia avellanedae* (ipê-roxo), cujos estudos apontam para atividade anti-inflamatória, antiviral, antiparasitária, antifúngica e contra bactérias Gram-positivas e negativas (EYONG et al., 2012). No que diz respeito a pesquisas envolvendo tuberculose, já foi definida sua ação em cepa padrão H₃₇Rv (CIM = 31,25 µg/mL) (UC-CACHÓN et al., 2014). Entretanto, não foram encontrados estudos sobre sua utilização em ambientes ácidos, o que motiva sua realização uma vez que a substância apresenta potencial para uso no tratamento. Por fim, tendo conhecimento da situação da TB no mundo e da necessidade pela descoberta de novos fármacos, este trabalho tem por objetivo ampliar o conhecimento sobre a atividade do lapachol e da sua combinação com a pirazinamida em pH ácido frente a *M. tuberculosis*.

Materiais e métodos

Cepa de referência e substância pura

A cepa de referência de *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC27294) foi utilizada para determinação da atividade do lapachol (*PubChem*: 3884) e do sinergismo dessa substância com a pirazinamida (*PubChem*: 1046) em pH ácido. O lapachol foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Exedito Leite Silva do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.

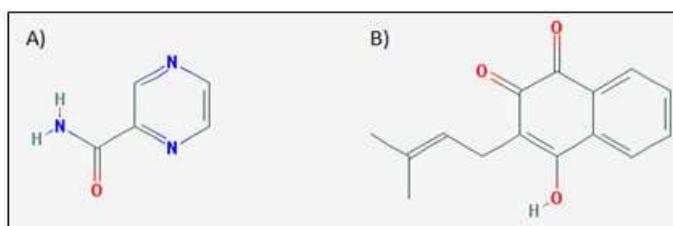


Figura 1. Estrutura molecular da pirazinamida em A e lapachol em B.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Foi utilizada microplaca estéril de 96 poços e o lapachol diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para se obter solução com concentração inicial de 1.000 µg/mL. Essas soluções foram colocadas na microplaca e em seguida, foram feitas diluições seriadas 1:2 (concentração no primeiro poço de 250 µg/mL). A bactéria foi previamente cultivada no meio Middlebrook 7H9 (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA)

suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA), por 15 a 21 dias em estufa bacteriológica à temperatura de 37 °C. Para o ensaio em ambiente ácido, o meio de cultura foi acidificado com ácido clorídrico (HCl) 1 M até obter pH 6,0. A cultura foi padronizada de acordo com escala de McFarland 1,0 com água destilada estéril. Essa solução foi diluída 1:20 com meio 7H9 e OADC, e adicionado 100 µL a cada poço da placa, exceto nos poços referentes ao controle positivo e negativo. Após incubação de sete dias à temperatura de 37 °C foi adicionado 30 µL de resazurina 0,02 % a todos os poços da placa. A técnica é fundamentada na capacidade do microrganismo se desenvolver e resultando na redução da resazurina, uma substância de cor roxa no estado oxidado e róseo quando reduzido. Portanto, a cor roxa se altera para róseo na medida em que houver crescimento bacteriano.

Ensaio de checkerboard

A técnica de combinações de substâncias foi realizada por *checkerboard* de acordo com Caleffi-Ferracioli et al. (2013). O lapachol foi combinado com PZA usando a mesma cepa de referência utilizada no REMA. As concentrações do lapachol e da pirazinamida variaram de 0,48-62,5 µg/mL e 3,12-800 µg/mL, respectivamente. O índice de concentração inibitória fracionada foi calculado pela fórmula: $ICIF = (CIM A + B / CIM A) + (CIM B + A / CIM B)$, em que CIM A + B representa a CIM da substância A quando combinada com B; CIM B + A, a CIM da substância B quando combinada com A; e CIM A e CIM B, a CIM das substâncias A e B testadas isoladamente. ICIFs ≤ 0,5 indicam atividade sinérgica, antagonismo se ≥ 4,0, e valores intermediários são aditivos ou indiferentes, conforme descrito em trabalhos anteriores sobre estudos de combinação antibacteriana.

Resultados e Discussão

A tabela 1 mostra os resultados do REMA e *checkerboard*. O lapachol apresenta CIM de 31,25 µg/mL em pH neutro, diminuindo para 7,8 µg/mL em pH 6,0, o que faz com que apresente uma concentração quase 13 vezes menor se comparado à PZA em pH ácido, e um efeito aditivo quando combinado ao fármaco padrão. Esse efeito tem seu valor farmacológico, pois as duas substâncias não são antagônicas, ou seja, a presença do lapachol não interfere na ação da pirazinamida, e vice-versa.

Os resultados obtidos a partir desse trabalho corroboram com estudos anteriores e os complementam ao verificar a atividade do lapachol e sua associação à PZA em meio ácido. A ação anti-*M. tuberculosis* com CIM inferior ao fármaco padrão e efeito aditivo, fazem do lapachol uma substância com potencial para ser utilizada na terapêutica.

Tabela 1. REMA e *checkerboard* das substâncias em *M. tuberculosis* H₃₇R_v.

CIM (µg/mL) pH 6,0					
REMA		<i>Checkerboard</i>			
lapachol	PZA	lapachol + PZA	PZA + lapachol	ICIF	Desfecho
7,8	100	3,9	50	1,0	Aditivo

CIM: concentração inibitória mínima; PZA: pirazinamida; ICIF: índice da concentração inibitória fracionada.

REMA: *resazurin microtiter assay plate*

Conclusões

O lapachol tem potencial para ser utilizado no tratamento da tuberculose por também apresentar atividade em pH ácido como a PZA, único fármaco que atua no microambiente ácido, e apresentar CIM menor que o fármaco padrão. Novos estudos dessa substância devem ser realizados para avançar no conhecimento desta substância no mecanismo de ação frente ao bacilo da tuberculose.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa e a todos do laboratório de Bacteriologia Médica.

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.

EYONG, K. O. et al. Cobalt mediated ring contraction reaction of lapachol and initial antibacterial evaluation of naphthoquinones derived from lapachol. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 2117–2122, 2012.

HEIFETS, L.; LINDHOLM-LEVY, P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. **The American review of respiratory disease**, v. 145, n. 5, p. 1223–5, 1992.

UC-CACHÓN, A. H. et al. Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 114–120, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Report 2016**.