

## ESTUDO DA ATIVIDADE DE DERIVADOS BENZOLHIDRAZÔNICOS EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Gabrielle Vaz da Silva (PIBIC/CNPq/AF/UEM), Eloísa Gibin Sampiron, Vanessa Guimarães Alves Olher, Fábio Vandresen, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Dayane Cristina Batista Leal, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: [rbiscodro@uem.br](mailto:rbiscodro@uem.br)

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

**Área e subárea: Microbiologia, Microbiologia Aplicada**

**Palavras-chave:** *Mycobacterium* spp., benzohidrazonas, resazurina.

### Resumo:

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) são bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* que são amplamente distribuídas na natureza. A patogenicidade das espécies das MNTs é variável, assim como os sinais e sintomas das doenças e seu tratamento estão relacionados com cada espécie e requer uma complexa combinação alternativa de antimicrobianos em um período longo de duração. Além disso, em muitos casos, as MNTs são resistentes aos antimicrobianos utilizados. As benzohidrazonas, também chamadas de iminas ou bases de Schiff, têm sido relatadas como potentes agentes antimicobacterianos e antibacteriano com promissor potencial ao tratamento da tuberculose. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de uma série de 19 benzohidrazonas frente a MNTs. Para a determinação da CIM dos derivados benzohidrazônicos, utilizou-se o método *resazurin broth microdilution assay* (REBMA) no qual se utiliza a resazurina como indicador da viabilidade celular. Os 19 derivados benzohidrazônicos testados não apresentaram CIM significativas nas concentrações testadas, apresentando em sua maioria CIM >250 µg/mL. Embora esses derivados não sejam ativos contra as MNTs de crescimento rápido e lento testadas, essas substâncias apresentaram resultados promissores quando testados frente a *Mycobacterium tuberculosis*, em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, demonstrando a importância destas substâncias químicas em outras bactérias deste gênero.

### Introdução

As micobactérias não tuberculosas (MNT) são bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, e que fazem parte de um complexo que compreende mais de 100 espécies, amplamente distribuídas na natureza. Geralmente as infecções causadas por essas bactérias são resultado de uma exposição ambiental, por ingestão de água contaminada, inalação de partículas ou aerossóis, ou inoculação através de equipamentos contaminados, sobretudo após procedimentos médicos invasivos. As MNTs podem ser classificadas como não patogênicas e

potencialmente patogênicas, e de crescimento rápido ou lento (CERCA, 2010). A patogenicidade das espécies de MNT é variável, assim como os sinais e sintomas das doenças, que muitas vezes se assemelham à evolução crônica da tuberculose podendo causar infecções pulmonares ou extrapulmonares, e por isso essas doenças são, muitas vezes, confundidas (HADAD et al., 2005). A identificação das espécies de MNTs exerce papel fundamental no esquema terapêutico. O tratamento está relacionado com cada espécie e requer uma complexa combinação alternativa de antibióticos em um período longo de duração. Além disso, em muitos casos as MNTs são resistentes aos antimicrobianos utilizados (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002). As benzohidrazonas são moléculas orgânicas classificadas como bases de Schiff e importantes derivados de N-acilhidrazonas. Apresenta em seu espectro de atividades ação antifúngica, antibacteriana, anticâncer e antioxidante (RAJ et al., 2004). Considerando o longo e difícil tratamento, esse trabalho tem por objetivo avaliar a atividade de 19 derivados benzoilhidrazônicos frente às MNTs, a fim de estudar novos possíveis candidatos ao tratamento das doenças causadas por essas bactérias.

## Materiais e métodos

### Preparo das substâncias

Os derivados benzohidrazônicos foram sintetizados e cedidos pela Profa. Dra Vanessa Guimarães Alves Olher, docente do Instituto Federal do Paraná e pelo Prof. Dr. Fábio Vandresen, docente da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Todas as substâncias foram diluídas em dimetilsulfóxido e mantidas em uma concentração de 10.000 µg/mL. O fármaco de referência, ciprofloxacino, utilizado como controle para validação do experimento, foi mantido em uma solução estoque de 400 µg/mL.

### Determinação da CIM

A CIM da substância testada foi realizada pelo método *resazurin broth microdilution assay* (REBMA), segundo Castilho et al. (2015), no qual utiliza-se a resazurina como indicador da viabilidade celular. As dezenove substâncias foram diluídas seriadamente em placas de 96 poços contendo meio Müller-Hinton com cátions ajustados (CAMHB). *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis*, ambas de crescimento rápido, foram cultivadas em CAMHB por 3 a 5 dias a 35 °C. Após, o inóculo foi ajustado em água destilada estéril utilizando-se a escala 0,5 de McFarland. Esse inóculo padronizado foi adicionado na placa, na qual foram feitas as diluições das benzohidrazonas (250 – 0,97 µg/mL). Esse ensaio foi incubado por 3 dias a 35° C. As micobactérias de crescimento lento, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium flavescens* foram cultivadas em CAMHB, por 7 a 14 dias a 35 °C e após padronização e adição na placa, esse ensaio foi incubado por 7 dias a 35 °C. Após esse período de incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina por poço da placa. Incubou-se novamente o ensaio por 24 h a 35 °C. A CIM foi o ponto onde não houve viragem da cor da resazurina na bactéria testada.

## Resultados e Discussão

Nossos estudos demonstraram que dentre as 19 substâncias avaliadas, nenhuma apresentou atividade significativa nas concentrações testadas. Substâncias com CIMs maiores que 250 µg/mL não são consideradas boas candidatas a fármacos, visto que seriam necessárias concentrações muito altas das substâncias para inibir o crescimento bacteriano. Dessa forma, isso poderia acarretar em aumento da citotoxicidade e, conseqüentemente, intensos efeitos adversos ao paciente. Entretanto, outros estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, frente a *Mycobacterium tuberculosis*, demonstraram que essas substâncias apresentaram resultados promissores, com CIM variando de 7,8 a >250 µg/mL.

**Tabela 1.** Atividade de derivados benzohidrazônicos frente a micobactérias não tuberculosas (MNTs) de crescimento rápido e de crescimento lento.

Derivados /fármaco	CIM (µg/mL)			
	MNTs de crescimento rápido		MNTs de crescimento lento	
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium flavescens</i>
1	>250	>250	>250	>250
2	>250	>250	>250	>250
3	>250	>250	>250	>250
4	>250	>250	>250	>250
5	>250	>250	>250	>250
6	>250	>250	>250	>250
7	>250	>250	>250	>250
8	>250	>250	>250	>250
9	>250	>250	>250	>250
10	>250	>250	>250	250
11	>250	>250	>250	>250
12	>250	>250	>250	>250
13	>250	>250	>250	>250
14	>250	>250	>250	>250
15	>250	>250	>250	>250
16	>250	>250	>250	>250
17	>250	>250	>250	>250
18	>250	>250	>250	>250
19	>250	>250	>250	>250
<b>CIP</b>	0,03	0,015	0,12	0,12

CIM: Concentração inibitória mínima; CIP: ciprofloxacino

## Conclusões

Embora os derivados não sejam ativos contra as MNTs de crescimento rápido e lento testadas, essas substâncias apresentaram resultados promissores quando testados frente a *Mtb*. O uso de *Mycobacterium smegmatis* tem sido proposto com um modelo avirulento para triagem de fármacos, como forma de substituição de técnica, porém como visto neste estudo, a triagem em MNTs e em *Mtb* tem resultados bem diferentes e não poderiam ser extrapolados. Portanto, os derivados benzohidrazônicos são considerados substâncias promissoras para atividade anti-TB, mostrando-se ineficazes para as MNTs testadas.

## Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa concedida, aos professores envolvidos na pesquisa e a equipe do laboratório de Bacteriologia Médica pela orientação na realização deste projeto.

## Referências

- CASTILHO, A. L. et al. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 119-121, 2015.
- CERCA, P. A. R. **Identificação de micobactérias não tuberculosas através de métodos moleculares não comerciais**. Dissertação de mestrado. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa. 2010.
- HADAD, D. J. et al. Micobacterioses: **Recomendações para o diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo, 2005.
- BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J.JR. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, v. 15, p.716-746, 2002.
- RAJ, K. K. V. et al. Synthesis of some bioactive 2-bromo-5-methoxy-N0-[4-(aryl)-1,3-thiazol-2-yl]benzohydrazide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 42, p. 427-429, 2007.