

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE N-ACILHIDRAZONAS DERIVADAS DA ISONIAZIDA EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Amanda Larissa Dias Leme (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eloísa Gibin Sampiron, Andressa Lorena Ieque, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Vanessa Guimarães Alves Olier, Fábio Vandresen, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br.

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

Área e subárea: Microbiologia - Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: MNT, resazurina, concentração inibitória mínima.

Resumo

As micobactérias não tuberculosas (MNT) encontram-se dispersas na natureza e apresentam patogenicidade variável, podendo colonizar o corpo humano e causar doenças. O tratamento das doenças causadas por essas bactérias é muito complexo e geralmente elas demonstram pouca sensibilidade aos fármacos usados para tratar a tuberculose. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade de N-acilhidrazonas derivadas da isoniazida frente a micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido e de crescimento lento. Para isso foi utilizada a técnica resazurin broth microdilution assay (REBMA). As CIMs das substâncias testadas apresentaram CIMs que variaram entre 1,9 e > 250 µg/mL. Os melhores resultados foram observados para *M. fortuitum* com CIMs variando entre 1,9 a 7,8 µg/mL. De modo geral, as substâncias demonstraram atividade promissora contra as MNT testadas, especialmente para as de crescimento rápido, e mais estudos devem ser realizados para confirmá-las como candidatas a futuros fármacos anti-MNT.

Introdução

As micobactérias não tuberculosas (MNT) estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas principalmente na água, no solo, em pedras, aerossóis, vegetais, protozoários e em muitas espécies de animais. As MNTs compreendem mais de 140 espécies identificadas até o momento, elas podem ser identificadas com base em testes fenotípicos, como o tempo de crescimento; e genotípicos, por testes moleculares como a PCR (reação em cadeia da polimerase). São consideradas micobactérias de crescimento rápido aquelas que desenvolvem colônias visíveis em meio sólido em menos de 7 dias, e as de crescimento lento as que desenvolvem colônias visíveis em meio sólido em mais de 7 dias. A maioria das MNTs são capazes de multiplicar-se mesmo em condições de escassez nutricional, temperaturas extremas e pH baixo. O tratamento das infecções causadas por essas

bactérias é bastante complexo, uma vez que elas são naturalmente resistentes ou possuem pouca sensibilidade aos fármacos usados para inibição do bacilo da tuberculose (KOH, 2017).

As *N*-acilhidrazonas são conhecidas por possuírem propriedades biológicas importantes, como o potencial antimicobacteriano (SAMPIRON et al. 2019), já relatado por diversos grupos de pesquisa. Considerando o tratamento complexo e prolongado, esta pesquisa tem o objetivo de avaliar a atividade de *N*-acilhidrazonas derivadas da isoniazida frente a MNTs, de crescimento rápido e de crescimento lento, com o intuito de estudar novos possíveis fármacos candidatos ao tratamento das doenças causadas por essas bactérias.

Materiais e métodos

Para determinar a atividade das substâncias sintéticas, foi utilizado o método resazurin broth microdilution assay (REBMA) (CASTILHO et al., 2015). Para isso, as MNT de crescimento rápido (*Mycobacterium fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae*) foram incubadas por um período de 3 a 5 dias em meio Müller-Hinton cátion ajustado (CAMHB) a 35-37 °C. Já as MNT de crescimento lento (*M. avium*, *M. gordonae*, e *M. flavescens*) foram incubadas por um período de 7 a 14 dias, também em CAMHB. As substâncias de interesse foram diluídas seriadamente (250-0,97 µg/mL) em microplacas de 96 poços contendo meio CAMHB. Então, as bactérias foram padronizadas utilizando-se escala 0,5 McFarland, diluídas 1:300, e adicionadas na placa. As placas foram incubadas por 3 dias a 30 °C para as MNT de crescimento rápido, e 7 dias para as de crescimento lento. Após o período de incubação, adicionou-se a resazurina (0,02%), que atua como um indicador de viabilidade celular. As placas foram incubadas novamente por mais 24 h, e a CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento micobacteriano.

Resultados e Discussão

Os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) das 11 *N*-acilhidrazonas testadas estão dispostos na tabela 1. Foram avaliadas seis diferentes espécies de MNT (três MNTs de crescimento rápido e três MNTs de crescimento lento). A CIM para as substâncias testadas variou de >250 a 1,9 µg/mL, considerando todas as MNTs testadas. No caso das MNT de crescimento rápido, os melhores resultados foram observados para *M. fortuitum*, pois a maioria das substâncias apresentou atividade contra essa bactéria, com CIM bem promissoras (1,9 a 7,8 µg/mL), exceto as substâncias (5) e (10), que não foram eficazes mesmo na maior concentração testada. Para *M. abscessus*, as substâncias (5) e (10) também não foram eficazes, enquanto todas as outras nove substâncias testadas apresentaram CIM que variou entre 31,25 e 125 µg/mL. Já no caso de *M. chelonae* a maior parte das substâncias não demonstrou atividade, visto que seriam necessárias concentrações muito altas das substâncias para inibir o crescimento bacteriano. A substância (11), no entanto, se destacou por apresentar excelente atividade, com CIM de 3,9 µg/mL. Para as MNT de crescimento lento *M. avium*, *M. gordonae* e *M. flavescens* foi possível observar

que as substâncias (5) e (6) inibiram o crescimento dessas bactérias, porém com CIM igual a 250 µg/mL. As outras substâncias, no entanto, não inibiram o crescimento bacteriano na maior concentração testada, apresentando CIM > 250 µg/mL.

Diversos autores têm estudado o potencial anti-MNT de substâncias químicas. Almeida et al. (2019), por exemplo, encontrou substâncias promissoras testando derivados químicos frente as MNTs, com CIM similares às encontradas aqui. Por outro lado, Sampiron et al. (2019) testou uma série de hidrazonas frente a MNTs de crescimento lento e rápido. Nesse caso, todas as substâncias testadas apresentaram CIM >250 µg/mL, não sendo, portanto, eficazes inibindo o crescimento micobacteriano. As substâncias aqui estudadas, no entanto, embora sejam da mesma classe foram eficazes, especialmente na inibição das MNT de crescimento rápido. Outros autores como Costacurta et al. (2020), também testaram a possível atividade anti-MNT de substâncias químicas, e não foram obtidos resultados promissores tanto para as MNTs de crescimento rápido quanto para as de crescimento lento.

Dessa forma, tendo em vista a capacidade das MNTs de se desenvolverem em condições adversas e sabendo da complexidade do tratamento das infecções causadas por elas, é imprescindível a busca por novos fármacos que possam ser eficientes contra essas bactérias.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima de *N*-acilhidrazonas derivadas da isoniazida frente a micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido e lento

Substâncias	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>
	<i>fortuitum</i>	<i>chelonae</i>	<i>abscessus</i>	<i>avium</i>	<i>gordonae</i>	<i>flavescens</i>
Concentração inibitória mínima (µg/mL)						
(1)	3,9	>250	125	>250	>250	>250
(2)	7,8	125	62,5	>250	>250	>250
(3)	3,9	>250	62,5	>250	>250	>250
(4)	3,9	>250	31,25	>250	>250	>250
(5)	>250	>250	>250	250	250	250
(6)	3,9	>250	62,5	250	250	250
(7)	3,9	>250	31,25	>250	>250	>250
(8)	1,9	>250	15,6	>250	>250	>250
(9)	1,9	>250	31,25	>250	>250	>250
(10)	>250	>250	>250	>250	>250	>250
(11)	3,9	3,9	62,5	>250	>250	>250
CIP	0,12	0,25	2,0	0,12	0,06	2,0

CIP: ciprofloxacino; *M. fortuitum*: *Mycobacterium fortuitum*; *M. chelonae*: *Mycobacterium chelonae*; *M. abscessus*: *Mycobacterium abscessus*; *M. avium*: *Mycobacterium avium*; *M. gordonae*: *Mycobacterium gordonae*; *M. flavescens*: *Mycobacterium flavescens*.

Conclusões

Considerando os resultados obtidos, as *N*-acilhidrazonas podem ser consideradas candidatas a futuros fármacos anti-MNT, apresentando resultados promissores tanto para as MNTs de crescimento rápido quanto para as de crescimento lento. Novos estudos devem ser feitos para elucidar o mecanismo de ação pelo qual essas substâncias inibem o crescimento micobacteriano.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa concedida, à Prof^a Dr^a Regiane Bertin de Lima Scodro e à equipe do laboratório de Bacteriologia Médica pelo auxílio e orientação na realização deste projeto.

Referências

ALMEIDA, A. L. et al. Eugenol and derivatives activity against *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria and other bacteria. **Future Microbiology**, v. 14, p. 331-344, 2019.

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.

COSTACURTA, G. F. et al. Synthesis and biological evaluation of 12 novel (-)-camphene-based 1,3,4-thiadiazoles against *Mycobacterium tuberculosis*. **Future Microbiology**, 2020.

KOH, W. J. Nontuberculous mycobacteria - overview. **Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections**, p. 653-661, 2017.

SAMPIRON, E. G. et al. Hydrazone, benzohydrazones and isoniazid-acylhydrazones as potential antituberculosis agentes. **Future Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 981-994, 2019.