

## ANÁLISE *IN SILICO* E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE SEMICARBAZONAS FRENTE A *Mycobacterium tuberculosis*

Emanuelle Finatto Dala Rosa (PIBIC/CNPq/UEM), Eloísa Gibin Sampiron, Andressa Lorena Ieque, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Fabio Vandresen, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br

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

**Área e sub-área:** Microbiologia – microbiologia aplicada

**Palavras-chave:** semicarbazonas, tuberculose, REMA.

### Resumo:

A tuberculose (TB), patologia infectocontagiosa causada por bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é caracterizada por ser altamente transmissível, sendo transmitida de pessoa a pessoa por gotículas de aerossóis, acarretando problemas de saúde mundial. O tratamento requer ao menos 6 meses utilizando quatro fármacos, sendo eles a isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. O maior problema enfrentado atualmente é a resistência dos bacilos ao tratamento. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicobacteriana de uma série de semicarbazonas frente a *Mycobacterium tuberculosis* por meio da técnica *resazurin microtiter assay plate* (REMA), bem como ensaios *in silico* de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) destas substâncias. As substâncias testadas apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) com valores entre 0,48 µg/mL e >250µg/mL, tendo destaque a substância **(21)** com a menor CIM. Também foram realizados ensaios *in silico* ADMET, os quais se enquadraram na regra dos cinco de Lipinski. Os resultados encontrados por meio deste estudo colocam essas substâncias como potenciais candidatas na busca de novas moléculas para o tratamento da tuberculose. Estudos mais aprofundados envolvendo a busca do mecanismo de ação da semicarbazona **(21)** devem ser encorajados, visto que a CIM é comparável a fármacos de primeira e segunda linha do tratamento da TB.

### Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, causada por bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e transmitida de pessoa a pessoa por gotículas de aerossóis. Mesmo sendo conhecida a milênios, continua sendo um dos grandes problemas de saúde pública mundial, principalmente em países subdesenvolvidos (WHO, 2021). A TB, antes da pandemia de COVID-19, era responsável pelo maior número de mortes em todo o mundo. Segundo o último relatório global da OMS de 2021, no ano de 2020, ocorreu queda em 18% das

notificações de TB entre 2019 e 2020, passando de 7,1 milhões, para 2,8 milhões, fato ocasionado em decorrência da pandemia de COVID-19 (WHO, 2021).

Atualmente, o esquema de tratamento é composto por quatro fármacos, sendo eles a rifampicina, etambutol, pirazinamida e isoniazida (DUARTE *et al.*, 2010). Apesar de bem estabelecido, problemas relacionados ao esquema terapêutico, como o longo tempo de tratamento e a resistência intrínseca do bacilo a diversos antibióticos, leva os pacientes ao abandono do mesmo (WHO, 2021).

Devido ao amplo perfil farmacológico, as semicarbazonas estão sendo extensivamente estudadas na Química Medicinal em decorrência de sua importante atividade como anticonvulsivantes, antichagásicos, hipnóticos, pesticidas e herbicidas (BERALDO, 2004).

Este trabalho tem como objetivo a busca por novas substâncias que possam fazer parte do tratamento anti-TB, como futuros protótipos de fármacos. Sendo assim, analisou-se uma série de nove semicarbazonas como potenciais substâncias anti-TB. Além disso, foi realizada análise *in silico* das substâncias testadas, como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET).

## Materiais e Métodos

As substâncias sintéticas foram cedidas pelo Prof. Dr. Fábio Vandresen do Laboratório de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *campus* Londrina, diluídas em dimetilsulfóxido e armazenadas sob refrigeração a 10.000 µg/mL.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das semicarbazonas frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, foi utilizado o método *resazurin microtiter assay plate* (REMA) (PALOMINO *et al.*, 2002). Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Inicialmente, adicionou-se nas cavidades laterais da microplaca, 200µL de água destilada, para manutenção da umidade. Em seguida, foi adicionado 100µL de meio líquido Middlebrook 7H9 (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose catalase), nos demais poços da microplaca. Foi realizada a diluição seriada das substâncias (250 a 0,95µg/mL) e da isoniazida (1 a 0,01 µg/mL), como fármaco controle. O crescimento bacteriano foi ajustado a escala 1 de McFarland, seguido da diluição 1:20. Foi adicionado 100µL da solução padronizada e diluída da bactéria em todos os orifícios da microplaca, com exceção do controle negativo, o qual contém apenas meio de cultura. A microplaca foi incubada por 7 dias, a 35 °C. Após incubação, foram adicionados 30µL de resazurina (0,01%), como solução reveladora, em cada cavidade da microplaca. Foi incubada novamente por 24h. Após isso, foi realizada uma análise visual pela mudança na coloração da resazurina, de azul para rósea, caracterizando a CIM, a qual determina a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para avaliar a absorção, distribuição metabolismo, excreção e toxicidade *in silico*, foram utilizados o *software* online e gratuito SwissADME, apresentando resultados importantes como peso molecular, permeabilidade da barreira hematoencefálica, entre outros dados que foram avaliados e, por meio do *software*

Osiris ADME, o qual forneceu dados a respeito de efeito irritante, mutagênico, tumorigênico e efeito reprodutivo.

## Resultados e Discussão

A busca por novos fármacos para o tratamento anti-TB é essencial, ocorrendo assim, um aumento significativo na busca por substâncias que possam fazer parte do esquema terapêutico da doença.

Os resultados obtidos das CIMs das semicarbazonas se mostraram muito promissoras, tendo as CIMs variando entre 0,48 e >250 µg/mL. A substância **(21)** destacou-se entre as demais, apresentando CIM de 0,48 µg/mL, a menor CIM encontrada. Por outro lado, as substâncias **(15)**, **(18)** e **(20)** apresentaram CIM de 15,6 µg/mL e a substância **(17)** CIM de 62,5 µg/mL. As demais substâncias **(9)**, **(11)**, **(13)** e **(19)** não apresentaram atividade na maior concentração testada (250 µg/mL).

Ao analisar as substâncias, a substância **(21)** apresentou destaque entre as demais substâncias, com CIM de 0,48 µg/mL, com grupamento hidroxila e grupo metóxi. As substâncias **(15)**, **(18)** e **(20)**, que apresentaram CIM de 15,6 µg/mL, possuem substituinte isatina e nitro respectivamente. Já a substância **(17)**, apresentou CIM de 62,5 µg/mL, apresentando o substituinte amina.

De acordo com o *software* Osiris, oito substâncias testadas não apresentaram efeitos irritante, mutagênico, tumorigênico e efeito reprodutivo, com exceção da substância **(17)**, a qual apresentou efeito mutagênico e tumorigênico. Com relação ao *drug score*, ou seja, a pontuação utilizada para avaliar o potencial geral do composto, a substância **(15)** destacou-se, apresentando 0.92, resultado muito próximo de 1. As demais substâncias apresentaram um bom *drug score*, com exceção da substância **(17)**.

O *software* Swiss, também utilizado para análise *in silico*, utiliza as regras de Lipinski como parâmetro para aprovar ou reprovar uma substância, estipulando os seguintes valores como referência: peso molecular ≤ 500, ≤10 aceptores de ligação de hidrogênio (HBA), ≤5 doadores de ligação de hidrogênio (HBD) e MLogP ≤4.15 (SAMPIRON *et al.* 2021). Todas as substâncias testadas atenderam a regra de Lipinski, sendo promissoras para o estudo.

Novos estudos serão realizados para determinar a CIM de novas substâncias e para explorar o potencial da semicarbazona **(21)**, visto que a CIM é comparável a fármacos de primeira e segunda linha do tratamento da TB.

## Conclusões

Os resultados obtidos por meio desse estudo ressaltam quatro substâncias com resultados promissores frente a *Mycobacterium tuberculosis*, destacando-se a substância **(21)**. De acordo com a análise *in silico*, oito substâncias mostraram-se promissoras, com exceção da substância **(17)**, e, de acordo com as regras de Lipinski, todas as substâncias atenderam aos requisitos. Novos estudos devem ser

realizados com objetivo de avaliar a citotoxicidade e mecanismos de ação das principais semicarbazonas para melhorar o entendimento de como elas atuam frente ao bacilo.

## Agradecimentos

Agradeço a CNPq pelo apoio financeiro para realização deste trabalho e a minha orientadora, Regiane, pela oportunidade proporcionada, contribuindo para a formação acadêmica.

## Referências

BERALDO, H. **Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos.** Quim. Nova, v. 27, n.3, P.461-471, 2004

DUARTE, R. *et al.*, **Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação,** Revista Portuguesa de Pneumologia, v.16, n.4, p.559-572, 2010.

PALOMINO, J. C. *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.

SAMPIRON, E. G. *et. al.* **In Vitro and In Silico Evaluations of Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Activity of Benzohydrazones Compounds.** Microbial Drug Resistance, v.27, n.11, 2021.

WHO, World Health Organization. (2021). **Global tuberculosis report 2021.**