

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO ANTITUBERCULOSE DE UMA SEMICARBAZONA COM A ISONIAZIDA, ETAMBUTOL E RIFAMPICINA

Emanuelle Finatto Dala Rosa (PIBIC/CNPq/UEM), Andressa Lorena Ieque, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Fabio Vandresen, 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.

Área e subárea do conhecimento: Microbiologia/Microbiologia aplicada.

Palavras-chave: Semicarbazona; *Mycobacterium tuberculosis*; *checkerboard*.

RESUMO

O complexo *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose (TB), caracteriza-se pela principal causa de morte por único agente infeccioso, acarretando problemas de saúde pública mundial. A TB é altamente transmissível, sendo transmitida de pessoa a pessoa pela inalação de aerossóis contendo o bacilo. O tratamento é complexo e requer ao menos 6 meses, utilizando um esquema poliquimioterápico com os fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol e pirazinamida. Atualmente, o maior problema a ser enfrentado é a resistência dos bacilos ao tratamento. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial sinérgico de uma semicarbazona associada com os fármacos isoniazida, rifampicina e etambutol por meio da técnica *resazurin drugs combination microtiter assay* (REDCA). O índice de concentração inibitória fracionada (FICI) $\leq 0,5$ foi considerado sinérgico. Foi observado sinergismo entre a semicarbazona (21) associada aos fármacos INH e RIF, com valores respectivos de FICI=0,375 e FICI=0,281. Os resultados promissores podem ser opção em futuras investigações de interação de medicamentos contra *M. tuberculosis*.

INTRODUÇÃO

A TB é uma doença infectocontagiosa, causada por bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e transmitida de pessoa a pessoa pela inalação de aerossóis contendo o bacilo. Mesmo sendo conhecida a milênios, continua sendo um dos grandes problemas de saúde pública mundial, principalmente em países subdesenvolvidos (WHO, 2022). Antes da pandemia de COVID-19, a TB era responsável pelo maior número de mortes em todo o mundo. De acordo com o último relatório global da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2022, em 2021 a pandemia continua impactando negativamente no diagnóstico da TB, diminuindo as notificações de 7,1 milhões em 2019 para 5,8 milhões em 2020. Nos anos de 2020 e 2021 houve aumento do número de mortes e transmissão comunitária (WHO, 2022).

O esquema terapêutico é composto por quatro fármacos, sendo eles a rifampicina, etambutol, pirazinamida e isoniazida. Visto o longo tempo de tratamento e a resistência intrínseca do bacilo aos antibióticos, muitos pacientes abandonam o mesmo (WHO, 2022).

As semicarbazonas vem sendo extensivamente estudadas na Química Medicinal devido ao amplo perfil farmacológico. As mesmas apresentam importante atividade antichagásica, anticonvulsivantes, hipnóticos, pesticidas e herbicidas (Beraldo, 2004).

Esta pesquisa objetiva a busca de novas substâncias que possam fazer parte do tratamento antituberculose, como futuros fármacos ou protótipos de fármacos, ou ainda que possam vir a compor o esquema poliquimioterápico, visto o longo tempo de tratamento e os efeitos colaterais acarretados pelo mesmo. Tendo isso em vista, foi analisado o potencial sinérgico da semicarbazona (21) com os fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RIF) e etambutol (EMB). O estudo visa a busca por novas substâncias que possam vir a compor o esquema poliquimioterápico, visto o longo tempo de tratamento e os efeitos colaterais acarretados pelo mesmo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo que busca novas substâncias com potencial para compor, futuramente, o esquema de tratamento da TB.

A substância sintética foi diluída em dimetilsulfóxido, em seguida, armazenada sob refrigeração a 10.000 µg/mL.

Para determinação do efeito combinatório entre a semicarbazona com a isoniazida, rifampicina e etambutol frente a cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, foi utilizado a técnica *resazurin drugs combination microtiter assay* (REDCA), em duplicata. O objetivo da técnica é a avaliação do potencial efeito sinérgico entre a substância e os fármacos utilizados no tratamento da TB (Caleffi-Ferracioli *et al.*, 2013).

A cepa *M. tuberculosis* foi cultivada em meio líquido Middlebrook 7H9 e suplementado com OADC. Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Como manutenção da umidade. Foi adicionado 200µL de água nas laterais da placa, com exceção do poço 1H, o qual é utilizado como controle negativo. Em seguida, foi adicionado 100µL de meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com OADC nos demais poços da microplaca, com exceção do poço 11A. No poço 1H, foi adicionado 200µL de meio Middlebrook 7H9. Para a combinação da semicarbazona (droga A) com o fármaco (droga B), a droga B foi adicionada em toda a coluna 11 e diluída seriadamente (100 µL), da direita para a esquerda, até a coluna 3, enquanto a droga A foi adicionada na linha A e diluída seriadamente (100µL) de cima para baixo, até a linha G. O crescimento bacteriano foi ajustado a escala 1 de McFarland, seguida da diluição 1:20. Foi adicionado 100µL do padronizado bacteriano em todos os poços da microplaca, com exceção do controle negativo que contém apenas meio de cultura. Em seguida, a microplaca foi incubada por 7 dias a 35°C. Após incubação, foi adicionado 30µL de resazurina, utilizada como solução reveladora, em cada poço da microplaca. Incubou-se novamente a placa por 24h. Em seguida, foi realizada

análise visual pela mudança da coloração de azul para rósea, podendo então, ser caracterizado a FICI da droga A combinada com a droga B. Para determinar a FICI de cada associação, foi utilizado a seguinte fórmula: $(CIM A + B / CIM A) + (CIM B + A / CIM B)$. As substâncias A e B isoladas são representadas, respectivamente por CIM A e CIM B. CIM A + B é referente ao valor da CIM da substância A combinada a substância B. Já a CIM B + A, refere-se a substância B combinada a substância A. Os efeitos combinatórios sinérgicos são classificados como sinérgico ($FICI \leq 0,5$), aditivo ($FICI > 0,5$ a $4,0$) e antagonista ($FICI > 4,0$) (Caleffi-Ferracioli *et al.*, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a interação entre medicamentos, todos os novos candidatos a fármacos devem ser testados com medicamentos rotineiramente utilizados no esquema básico (EB) de tratamento da TB, uma vez que interações antagônicas podem prejudicar o tratamento e, portanto, facilitar a seleção de bacilos resistentes.

Foram testados três fármacos do EB associados à semicarbazona. Os resultados obtidos do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) da semicarbazona combinada com a isoniazida, rifampicina e etambutol que estão descritos na tabela 1.

Ao combinar a substância (21) com INH, EMB e RIF obteve-se, respectivamente, $FICI=0,375$, $FICI=1,13$ e $FICI=0,281$. Segundo a metodologia de referência, a combinação da substância (21) com INH e RIF foram classificadas como sinérgica, enquanto a combinação com EMB foi classificada como aditiva.

Considerando que se busca o sinergismo entre a substância (21) e os fármacos testados, a FICI de INH e EMB mostraram-se promissoras. O resultado de sinergismo com RIF também foi encontrado por Costacurta *et al.* (2020) quando testado com tiadiazóis derivados do (-)-canfeno. Outros autores (Sampiron *et al.*, 2019) encontraram sinergismo de acilhidrazonas com INH, corroborando com este estudo.

Tabela 1: Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) dos fármacos Isoniazida, Rifampicina e Etambutol associado a substância (21), frente a cepa referência H₃₇Rv.

Fármaco	Substância	FICI
Isoniazida (INH)	21	0,375
Etambutol (EMB)	21	1,13
Rifampicina (RIF)	21	0,281

CONCLUSÕES

Com exceção de EMB, os fármacos INH e RIF associados a substância (21) mostraram-se promissores, sendo classificados como sinérgicos. A combinação de fármacos para o tratamento da TB é uma ferramenta muito utilizada, visto que são associados medicamentos já conhecidos com os antituberculosos clássicos. Nesse sentido, a busca por novas substâncias capazes de diminuir o efeito colateral e o tempo de tratamento vem sendo extensivamente estudadas atualmente. Novos estudos devem ser realizados com objetivo de avaliar a citotoxicidade e o mecanismo de ação da substância (21) frente ao bacilo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária pelo apoio financeiro para realização deste trabalho e a minha orientadora, Regiane Bertin de Lima Scodro, pela oportunidade proporcionada, contribuindo para a formação acadêmica. Agradeço o Prof. Dr. Fábio Vandresen pela substância cedida para o estudo.

REFERÊNCIAS

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/dQXNGvqTcfRjbn88VzV9J/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 7 maio 2023.

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.

COSTACURTA, G. F. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 12 novel (-)-camphene-based 1, 3, 4-thiadiazoles against *Mycobacterium tuberculosis*. **Future Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 723-738, 2020.

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

WHO, World Health Organization. **Global tuberculosis report 2022**.