

ATIVIDADE ANTI-*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DE UMA *N*-SALICILHIDRAZONA EM COMBINAÇÃO COM FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE

Camilla de Lima Ruffini (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Andressa Lorena Ieque, Rafaela Souza Cavallaro, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Rosilene Fressatti Cardoso, Vanessa Guimarães Alves Olher, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora). E-mail: rblscodro@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Microbiologia /Microbiologia aplicada

Palavras-chave: Tuberculose; *checkerboard*; hidrazonas

RESUMO

A tuberculose (TB), causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é altamente contagiosa e tem um impacto significativo na saúde global. O tratamento abrange 6 meses e consiste em quatro medicamentos-chave: isoniazida, rifampicina e etambutol. As hidrazonas, um grupo orgânico com propriedades químicas e biológicas notáveis, têm potencial terapêutico. Este estudo avaliou a eficácia anti-*M. tuberculosis* de uma *N*-salicilhidrazona em conjunto com fármacos antituberculose usando o método de associação de fármacos, *resazurin drugs combination microtiter assay* (REDCA). A análise das interações revelou que os fármacos foram aditivos, uma vez que todos apresentaram FIC_I=2. Embora não tenha apresentado resultado sinérgico, o potencial anti-TB da substância aditiva é relevante, despertando testes adicionais com outros fármacos pelo método REDCA e ensaios mais aprofundados com a substância química estudada.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma enfermidade originada por microrganismos pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, constituindo-se em um dos mais prementes desafios em saúde pública e uma das principais causadoras de morte globalmente. Durante um longo período, a TB se destacou como a principal responsável por óbitos em decorrência de um único agente infeccioso, superando inclusive o HIV/AIDS (WHO, 2022). A evolução da doença está intrinsecamente ligada a fatores socioeconômicos, como pobreza, subnutrição, tabagismo, diabetes, consumo de álcool e a frequentemente observada coinfeção com HIV (WHO, 2022).

No âmbito da pesquisa, as hidrazonas emergem como um grupo orgânico notabilizado por suas propriedades químicas e biológicas diversificadas, abrangendo

atividades antivirais, antifúngicas, antibacterianas, entre outras. O interesse suscitado pela investigação dessas atividades biológicas tem impulsionado a síntese de novos derivados por meio de modificações estruturais. Múltiplos estudos preconizam que esses derivados sintéticos contendo tais grupos funcionais podem ser promissores como agentes terapêuticos (Guimarães *et al.*, 2017).

Na busca por novos agentes terapêuticos, a expectativa é que tais substâncias possam não apenas reduzir a duração do tratamento para enfermidades infecciosas, mas também sejam compatíveis com os fármacos já existentes, apresentem ação sinérgica e não interfiram negativamente com outros medicamentos (Caleffi-Ferracioli *et al.*, 2013). Nesse contexto, a avaliação da atividade antimicobacteriana quando dois ou mais agentes são combinados torna-se crucial para a proposição de novos esquemas terapêuticos (Bhusal *et al.*, 2005).

O estudo do sinergismo entre fármacos pode ser realizado por meio do método conhecido como *checkerboard*. No entanto, a aplicação desse método para *M. tuberculosis* (*Mtb*) enfrenta desafios, como um longo período de incubação e a leitura (Caleffi-Ferracioli *et al.*, 2013). Nesse contexto, foi explorada a atividade anti-*Mtb* de *N*-salicilhidrazonas (dados não publicados) e, considerando resultados promissores de concentração inibitória mínima e citotoxicidade, prosseguiu-se investigando seu potencial sinérgico com fármacos já empregados no tratamento da TB, a saber: isoniazida, etambutol e rifampicina.

MATERIAIS E MÉTODOS

O efeito combinatório entre a *N*-salicilhidrazona e os fármacos de primeira linha para o tratamento da TB foi realizado pelo método de ensaio *resazurin drugs combination microtiter assay* (REDCA), de acordo com Caleffi-Ferracioli *et al.* (2013). Para avaliar possíveis efeitos sinérgicos com os fármacos, o índice de concentração inibitória fracional (FICI), foi calculado pela fórmula: $FICI = (CIM A + B / CIM A) + (CIM B + A / CIM B)$. O valor CIM A + B é a CIM da substância A quando combinada com a substância B, enquanto CIM B + A é a CIM da substância B quando combinada com a substância A. A CIM A e CIM B representa a CIM das substâncias determinadas isoladamente. Os efeitos das combinações serão classificados como: sinérgico ($FICI \leq 0,5$), aditivo ($FICI > 0,5$ a 4,0) e antagonista ($FICI > 4,0$).

Cepa de referência Mycobacterium tuberculosis, fármaco padrão e substância sintética

A cepa de referência *M. tuberculosis*, foi cultivada em meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase) a 35 °C por 15 a 21 dias. A solução de isoniazida e etambutol utilizados como fármacos, foram preparados em concentração de 5.000 µg/mL, respectivamente e a solução de rifampicina utilizada foi preparada em concentração de 4.000 µg/mL, foram esterilizados por filtração e armazenada a -20 °C. Para cada um dos fármacos preparou-se uma solução estoque na concentração de 4.000 µg/mL para isoniazida,

1.000 µg/mL para etambutol e 400 µg/mL para a rifampicina, posteriormente armazenadas sob refrigeração.

A substância sintética testada (10) foi preparada em concentração 10.000 µg/mL. Essa substância foi previamente triada em nosso laboratório apresentando atividade promissora anti-*M. tuberculosis* (cepa padrão). Para o teste de cada combinação substância + fármaco foram feitas placas em triplicatas de modo a corroborar os resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse estudo associou uma substância química sintética (10) com fármacos padrão do esquema de tratamento, contra a bactéria da TB. Os resultados alcançados por meio desse experimento estão descritos na tabela 1. O resultado da FICI para os três fármacos foi de FICI=2 que, de acordo com a metodologia, é considerada como aditiva, a combinação entre fármaco e a substância pura. Embora os valores obtidos não foram considerados sinérgicos, não se descarta a possibilidade de ser uma substância promissora anti-TB, visto que, não houve efeito antagônico. Um outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (Valverde *et al.* 2022) quando testado com derivados 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos, demonstrou resultado de sinergismo com rifampicina.

Tabela 1. Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) dos fármacos isoniazida, rifampicina e etambutol associado com a substância sintética (10) frente a cepa referência *H₃₇R_v*.

Fármaco	Substância	FICI
Etambutol	10	2
Isoniazida	10	2
Rifampicina	10	2

CONCLUSÕES

Todos os fármacos testados foram classificados como aditivos de acordo com a metodologia adotada. Embora não tenha apresentado resultado sinérgico, o potencial anti-TB da substância aditiva é relevante, despertando testes adicionais com outros fármacos pelo método de associação de fármacos e ensaios mais aprofundados com a substância química estudada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária (FA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Profa. Dra. Vanessa Guimarães Alves Olher, do Laboratório de Química do Instituto Federal do Paraná (IFPR), *campus* Paranavaí, pela cessão da substância química.

REFERÊNCIAS

GUIMARÃES, R.M. *et al.* Tuberculose, HIV e pobreza: tendência temporal no Brasil, Américas e mundo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, p. 511-517, 2012.

BHUSAL, Yogesh; SHIOHIRA, C. M.; YAMANE, N. Determination of *in vitro* synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 4, p. 292-297, 2005.

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. C. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660-663, 2013.

VALVERDE, T. L. *et al.* 3, 5-dinitrobenzoylhydrazone derivatives as a scaffold for antituberculosis drug development. **Future Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 267-280, 2022.

WHO, World Health Organization. **Global tuberculosis report 2022**. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>. Acesso em: 24 ago. 2023.