ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE 1,3,4-TIADIAZÓIS

Sofia Ortolan Diel (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Rafaella Souza Cavallaro, Fabio Vandresen, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora). E-mail: rblscodro@uem.br.

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

Ciências da Saúde / **Microbiologia** / **Microbiologia médica**

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; teste de sensibilidade de antimicrobianos; derivados da isoniazida.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma enfermidade causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de ser prevenível e curável, estima-se que a TB acomete mais de 10 milhões de pessoas anualmente. Neste trabalho avaliou-se a atividade antimicobacteriana de cinco substâncias 1,3,4-tiadiazóis (TDZ) derivados da isoniazida, frente a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb)* H_{37}Rv. Empregou-se o método *resazurin microtiter assay plate* (REMA) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos derivados. Realizou-se o cultivo bacteriano em *Middlebrook* 7H9, durante 15 a 21 dias a 35°C. Os meios usados tinham pH 6,0 e 6,8 e os fármacos controles foram pirazinamida e isoniazida, respectivamente. As concentrações testadas dos derivados iniciaram em 250 µg/mL. A leitura da placa, após 7 dias, foi feita pela redução da resazurina, indicando metabolismo bacteriano ativo. Em pH 6,8, observou-se que o TDZ-1,2 e 4 apresentaram CIM=250 µg/mL, enquanto os outros TDZs (3 e 5) apresentaram CIM≥250 µg/mL, indicando crescimento em todas as concentrações testadas. Em pH 6,0, a maioria dos compostos tiveram CIM≥250 µg/mL. Conclui-se que apenas o derivado TDZ-4 manteve a atividade antimicobacteriana em pH 6,8 e pH 6,0.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma enfermidade causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de ser prevenível e curável, estima-se que a TB acometeu mais de 10 milhões de pessoas e levou 1,1 milhão de óbitos no mundo em 2022 (WHO, 2023). A transmissão ocorre pela dispersão de aerossóis vindos da tosse, espirro ou fala de indivíduos com a TB pulmonar ativa (Brasil, 2019).

O esquema terapêutico consiste na administração de quatro medicamentos anti-TB de primeira linha: pirazinamida (PZA), etambutol (EMB), isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) durante 6 meses (Brasil, 2019). A falha na execução e o abandono do tratamento são fatores que podem induzir ao aparecimento de *Mtb* resistente. Em 2022, a estimativa mundial de resistência aos fármacos era de 410 mil casos de TB

resistente à RIF (RR) ou multirresistente (MDR, resistência à RIF e INH) (WHO, 2023).

Os tiadiazóis são um grupo químico que possui um anel pentamérico heterocíclico, contendo um átomo de enxofre (S) e dois átomos de nitrogênio (N). Eles podem ocorrer como quatro formas isoméricas, sendo nomeadas de acordo com a posição dos átomos S e N no anel. São elas: 1,2,3-tiadiazóis; 1,2,5-tiadiazóis; 1,2,4-tiadiazóis e 1,3,4-tiadiazóis (Haider *et al*., 2015). Uma revisão feita por Haider e colaboradores (2015) destaca diversos compostos 1,3,4-tiadiazóis sintetizados por outros autores e seus potenciais terapêuticos, como anti-inflamatórios, anticâncer e antimicrobianos. Eles também estão presentes em medicamentos comercializados, como a cefazolina, cefalosporina de primeira geração.

Diante do que foi apresentado, e considerando a importância da pesquisa de agentes anti-TB, o objetivo deste trabalho foi investigar se cinco 1,3,4-tiadiazóis análogos sintéticos da INH, chamados aqui de TDZ (1-5), possuíam atividade antimicobacteriana frente a cepa referência H_{37}Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi empregado o método de *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) para investigar a suscetibilidade micobacteriana e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da cepa padrão H_{37}Rv de *Mtb* frente a estes novos análogos. O REMA foi realizado usando o protocolo montado pelo Laboratório de Bacteriologia Médica da UEM. Os derivados usados foram sintetizados e cedidos pelo professor Fábio Vandresen da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina – PR.

A cepa H_{37}Rv de *Mtb* foi cultivada em *Middlebrook* 7H9 suplementado com OADC (Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase) e com pH levemente básico (±6,8) durante 15 a 21 dias na estufa a 35°C. No REMA foram usados meio 7H9 com pH 6,0 e 6,8.

As concentrações testadas na placa de 96 poços para os derivados iniciaram-se em 250 µg/mL, caindo pela metade a cada poço com a diluição seriada. Partindo de uma concentração inicial das substâncias (estoque) de 10.000 µg/mL, diluiu-os em um eppendorf para chegar a 1.000 µg/mL. Assim, ao adicionar as substâncias na coluna 2, as concentrações caem quatro vezes, chegando em 250 µg/mL.

Desta forma, para atingir a concentração inicial desejada na placa, utilizou-se 25 µL do estoque dos compostos TDZ e 225 µL de meio de cultura, totalizando 250 µL. Cada derivado foi testado em duplicata em uma única placa de 96 poços.

Os fármacos controles foram a INH para o REMA com o pH 6,8, e a PZA para o pH 6,0. A diluição deles foi diferente dos derivados, pois suas CIM já são conhecidas. A PZA tem CIM=100 µg/mL e INH tem CIM=0,06 µg/mL, assim as concentrações na placa não seguem as mesmas para a testagem das substâncias. Para a PZA e INH, calculou-se a concentração para que suas CIM fossem vistas no 5º poço de reação.

Nas colunas 1 e 12 e linhas A e H da placa, adicionou-se 200 µL de água destilada estéril. Nos poços restantes, colocou-se 100 µL de meio de cultura, e mais 100 µL nos controles negativos. Na coluna 2, adicionou-se 100 µL dos derivados e

realizou-se a diluição seriada, no sentido esquerda-direita, transferindo 100 µL de um orifício para o outro até a coluna 10, desprezando 100 µL ao final.

Na preparação do inóculo bacteriano, retirou-se, no mínimo, 2 mL do repique de *Mtb* entre 15-21 dias, adicionando-o em um tubo com cacos de vidro, e agitou-se no vórtex e aguardou a sedimentação do inóculo. Em seguida, retirou-se uma alíquota do sobrenadante e colocou-o em um tubo de espectrofotômetro, acrescentando água destilada estéril até completar 3 mL. No espectrofotômetro, ajustou-se o inóculo dentro da escala de McFarland 1, DO 625 nm (0,16-0,20).

Após a padronização, diluiu-se a suspensão bacteriana na proporção de 1:20. Para uma placa, o cálculo foi feito considerando o volume final da diluição como 10 mL, assim, adicionou-se 500 µL do inóculo padronizado em 9500 µL de meio de cultura. Logo após, colocou-se 100 µL da diluição na placa e nos controles positivos. As placas foram seladas e incubadas na estufa a 35ºC por 7 dias.

Depois de 7 dias de incubação, as placas foram reveladas com resazurina 0,01%. Adicionou-se, 30 µL da solução em todos os orifícios de reação, começando pelos controles, seguindo o sentido direita-esquerda até a coluna 2. As placas foram incubadas a 35°C e a leitura foi feita após 24-48 h de incubação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitas quatro placas de REMA, sendo duas com pH 6,0 e outras duas com pH 6,8. A interpretação foi feita de acordo com a redução da resazurina (coloração azul) a resorufina (coloração rósea) pelo metabolismo ativo, assim, os poços com coloração rósea indicam que houve crescimento bacteriano. Na placa com pH 6,8, o TDZ 1, 2, e 4 demonstraram atividade nas concentrações testadas (250 µg/mL). Como é possível ver na Figura 1, o TDZ-4 apresentou CIM=250 µg/mL, enquanto que para os outros TDZs (3 e 5), a resazurina foi reduzida em todos os poços de reação, indicando que nenhuma das concentrações testadas funcionaram para inibir o crescimento de *Mtb*, assim podemos afirmar apenas que possuem CIM≥250 µg/mL.

No REMA com pH 6,0, observou-se que todos as substâncias apresentaram CIM≥250 µg/mL, exceto o TDZ-4 que manteve a mesma atividade nos dois pHs (250 µg/mL). Assim conclui-se que a mudança de pH não melhorou a atividade anti-*Mtb* nas concentrações avaliadas.

A mesma metodologia, com pH 6,8 e 6,0 também foram realizados por Costacurta *et al*. (2020), testando 1,3,4-tiadiazóis derivados do (-)-canfeno. No estudo, pode-se observar que algumas substâncias também apresentaram aumento da CIM ao serem expostos em pH mais ácido (6,0), são os casos dos compostos 6b e 6h. Está mudança pode sugerir uma pequena perda de atividade das substâncias em meios mais ácidos.

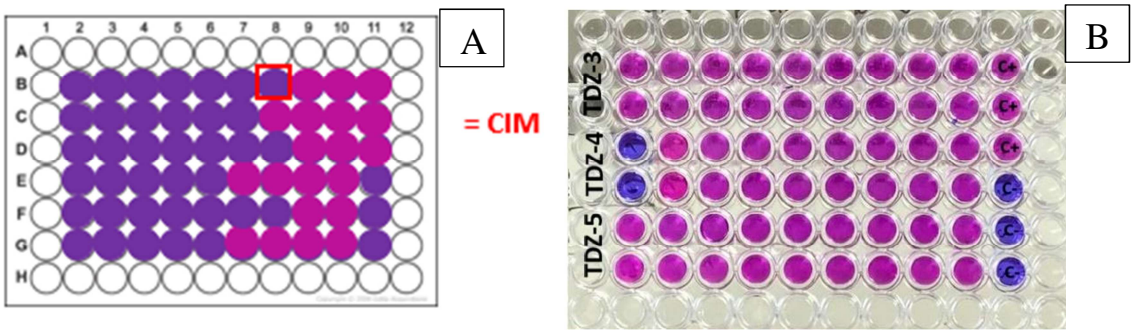

Figura 1. Esquema da metodologia utilizando resazurina para os compostos testados (A) e exemplo de microplaca com tiadiazós em pH 6,8 (B).

CONCLUSÕES

Conclui-se que apenas o derivado TDZ-4 apresentou ação contra *M. tuberculosis*, nos dois pHs, dentro das concentrações avaliadas neste estudo. Entretanto, mais estudos aprofundados seriam necessários para elucidar esta questão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Prof. Dr. Fabio Vandresen do Laboratório de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *campus* Londrina, pela cessão da substância química.

REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019.

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, ed. 9, p. 723-738, 2020. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fmb-2019-0258. Acesso em: 17 ago. 2024.

HAIDER, S. *et al*. 1,3,4-Thiadiazoles: A potent multi targeted pharmacological scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 156-177, mar. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global tuberculosis report 2023**. Genebra: 2023. Disponível em: https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023. Acesso em: 17 ago. 2024.