

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DA ISONIAZIDA EM *Mycobacterium tuberculosis*

Heloisa Signorini Azevedo (PIC/CNPq/FA/Uem)¹; Maria Julia Maeda (PIC/CNPq/FA/Uem)¹; Larissa de Souza Brianezi²; Ingrid Beatriz Campanha²; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli (Orientadora)³.krcferracioli2@uem.br

¹Acadêmica de Graduação, Universidade Estadual de Maringá.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

³Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá- PR.

Área e subárea do conhecimento: Microbiologia, Biologia e Fisiologia dos Microrganismos/Bacteriologia

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Isoniazida; Tuberculose multirresistente.

RESUMO

A tuberculose, causada por bacilos do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, ainda infecta cerca de um quarto da população mundial. A transmissão ocorre por vias aéreas, através da eliminação de bacilos em aerossóis liberados na tosse, fala ou espirro de pessoas com tuberculose ativa. O tratamento é longo, complexo e poliquimioterápico. O surgimento de bacilos resistentes aos fármacos tem dificultado a terapia. A isoniazida é um dos principais medicamentos utilizados, porém a resistência crescente a esse fármaco tem reduzido sua eficácia, exigindo novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, a síntese de derivados de isoniazida com ação frente a cepas resistentes surge como estratégia promissora para o tratamento da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana in vitro de derivados sintéticos de isoniazida contra *M. tuberculosis*. Foram testados 11 derivados (ACH 01, 03, 05, 06, 08, 09, 10, 11, 12, 13 e 16) frente à cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv e ao isolado clínico resistente *M. tuberculosis* 73A (MDR), utilizando a técnica REMA (*Resazurin Microtiter Assay Plate*). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano. Entre os compostos estudados, o ACH01 apresentou a menor CIM (0,5 µg/mL) para a cepa H37Rv, enquanto o ACH09 foi o mais eficaz frente ao isolado clínico resistente (4 µg/mL). Assim, os derivados ACH01 e ACH09 destacaram-se como promissores, sendo necessária a continuidade dos estudos para explorar seu potencial como protótipos de fármacos antituberculose.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) causada por bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é considerada uma das doenças mais antigas e persistentes da humanidade. Está presente em todos os países do mundo, em diversas faixas etárias, sendo a segunda causa de morte por um único agente infeccioso (World Health Organization, 2023; Hijjar, *et al* 2007). A alta infecção desta doença se dá pela facilidade de transmissão, através das vias respiratórias pela eliminação de aerossóis eliminados na tosse, fala ou espirro de uma pessoa infectada (Ministério da Saúde, 2024). O tratamento atual convencional para TB utiliza quatro medicamentos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) por um período de seis meses a um ano (OMS, 2008). A isoniazida (INH), é um pró-fármaco capaz de inibir a síntese de ácidos micólicos, presente na parede celular das micobactérias, é um dos principais medicamentos na terapia antituberculosa, (O'Connor, *et al* 2024) mas a resistência a este fármaco tem diminuído sua eficácia, exigindo novas opções terapêuticas. Diante disso, este estudo buscou avaliar a atividade antimicobacteriana de moléculas de 11 derivados de isoniazida em Mtb sensível e resistente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese das moléculas.

Foram estudadas 11 moléculas (ACH 01, 03, 05, 06, 08, 09, 10, 11, 12, 13 e 16) sintetizadas e gentilmente fornecidas pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná em parceria com o Prof. Fábio Vandresen. A isoniazida foi adquirida comercialmente na Sigma-Aldrich (St. Louis), preparada conforme orientação do fabricante e posteriormente diluída em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Le Pont de Claix, France) suplementado com OADC, ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) para a realização dos experimentos.

Bactérias estudadas.

Foram utilizadas neste estudo a cepa de referência *Mtb H₃₇Rv* (ATCC 27294) e o isolado clínico *Mtb* 73A, pertencente à bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Maringá (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) número A6486FE). Os bacilos foram cultivados em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e incubados de 15 a 21 dias a 35 °C para atingir o crescimento logarítmico ideal para os ensaios posteriores.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As suspensões bacterianas de *Mtb H₃₇Rv* e *Mtb* 73A foram padronizadas com escala de McFarland nº 1, diluídas em Middlebrook 7H9 e adicionadas em microplacas de 96 poços contendo as diluições seriadas dos compostos a serem testados (0,01-1024 µg/mL), de acordo com o método descrito por Palomino (2002).

As microplacas foram incubadas a 35 °C em atmosfera normal por 7 dias, e após esse período, 30µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) recém-preparada foi adicionada a cada poço e as placas foram incubadas novamente a 35°C por 24h para posterior leitura visual. A mudança da cor azul para rosa pela redução da resazurina foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano. Como controle do ensaio foram utilizados os fármacos de referência isoniazida e rifampicina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da atividade antimicrobiana das moléculas estudadas, expresso pela CIM, está presente na Tabela 1. Valores variáveis de CIM foram observados de acordo com a cepa/isolado clínico estudado. A eficácia anti-TB da Rifampicina (RIF) e Isoniazida (INH) foi confirmada.

Entre os derivados de INH estudados, ACH01 foi o de menor CIM (0,5 ug/mL) para *Mtb* H37Rv e o ACH09 (4 ug/mL) para *Mtb* 73A. Considerando que CIM <10 é considerada promissora para continuidade dos estudos pré-clínicos, vale ressaltar que neste estudo 10 moléculas ACH (01, 03, 05, 06, 08, 09, 10, 11, 13, 16) se mostraram promissoras quando avaliadas contra *Mtb* H37Rv e 3 moléculas ACH (01, 09, 16) contra *Mtb* 73A. As moléculas ACH 01 e 09 apresentaram menor CIM para a cepa sensível de *Mtb* e para o isolado clínico de *Mtb* resistente.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana (µg/mL) de derivados da isoniazida em *M. tuberculosis*

Bactéria	Perfil	Derivados ACH (µg/mL)												
		RIF	INH	01	03	05	06	08	09	10	11	12	13	16
H ₃₇ Rv	INH ^S /RIF ^S /PZA ^S	0.03	0.06	0.5	4	1	8	8	4	4	8	512	8	4
73A	INH ^R /RIF ^R /PZA ^R (MDR)	16	2	8	64	128	128	32	4	512	16	1024	128	8

(MDR): multirresistente:INH^R Isoniazida, RIF^R Rifampicina e PZA^R Pirazinamida. INH^S/RIF^S/PZA^S Sensível.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que as modificações da estrutura da isoniazida geraram derivados com potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Os resultados de CIM chamam a atenção especialmente para as moléculas ACH 01 e 09, como as que tiveram menor CIM para a cepa sensível de *Mtb* e para o isolado clínico de *Mtb* resistente. Novos ensaios serão conduzidos a fim de elucidar melhor a atividade dessas moléculas e o potencial anti-TB.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Laboratório de Bacteriologia Médica pelo apoio na realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tuberculose**. Portal gov.br.

HIJJAR, M. A.; GERHARDT, G.; TEIXEIRA, G. M.; PROCÓPIO, M. J. Retrospect of tuberculosis control in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 41(Supl. 1):50-58, 2007.
O'CONNOR, C.; PATEL, P.; BRADY, M. F. **Isoniazid**. StatPearls, 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Implementando a Estratégia Stop TB da OMS: um manual para programas nacionais de controle da tuberculose**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Tuberculosis**. Genebra: OMS, 2023.