POTENCIAL DA PIRAZINAMIDA COMBINADA A *N*-SALICILHIDRAZONA (SH18) CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* SOB PH ÁCIDO

Luanna Milani de Souza (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Sofia Ortolan Diel, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Jean Eduardo Meneguello, 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 subárea do conhecimento: Microbiologia, Microbiologia Aplicada.

Palavras-chave: Tuberculose; Pirazinamida; Combinação de Medicamentos.

RESUMO

A tuberculose (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), permanece como um grave problema de saúde pública, sendo a pirazinamida (PZA) um fármaco essencial do tratamento devido à sua ação em pH ácido. Nesse contexto, avaliou-se a interação entre a PZA e a *N*-salicilhidrazona 18 (SH18), um composto com promissores resultados pré-clínicos *in vitro*. Para isso, a cepa H_{37}Rv de *Mtb* foi submetida ao ensaio de *checkerboard* em pH 6,0, utilizando diluição seriada de ambos os compostos. Após 7 dias de incubação a 37 °C, adicionou-se resazurina para leitura fluorimétrica. Os resultados de fluorescência relativa foram processados no GraphPad Prism 8.0.1 e, a partir deles, calculou-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI, do inglês *Fractional Inhibitory Concentration Index* e o Fator Modulador-FM). A interação de PZA e SH18 foi classificada como indiferente/aditiva (0,5>FICI≤4), pois apresentarou FICI igual a 0,9. O FM foi de 1,9 demonstrando que a SH18 pode modular a atividade da PZA cerca de 2 vezes. Conclui-se que a SH18 não interage de maneira negativa com a PZA e pode modular sua atuação, além disso, verificou-se que a acidificação não contribui para a atividade da SH18.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), que acomete predominantemente os pulmões, mas outros órgãos e/ou sistemas podem ser afetados também (BRASIL, 2025). A propagação da TB é acontece através das vias respiratórias, decorrente da inalação de aerossóis expelidos por um paciente com TB laríngea ou pulmonar ativa (BRASIL, 2019). Os sintomas e sinais mais comuns são febre vespertina, sudorese noturna, emagrecimento e tosse persistente em um período de três semanas ou mais (BRASIL, 2025).

A TB é uma doença tratável e prevenível, porém, em 2024 cerca de 10 milhões de pessoas continuam adoecendo anualmente e mais de 1 milhão vieram a óbito por causa da doença, caracterizando-a como a principal causa de óbito mundial decorrente de um único agente infeccioso. Atualmente, cerca de 90% das pessoas doentes podem ser curadas através do esquema terapêutico padrão de 6 meses recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Ademais, a incidência da

infecção, a progressão para a doença e, consequentemente, a mortalidade por TB podem ser reduzidas mediante ações multissetoriais que abordem seus determinantes mais amplos, como pobreza e desnutrição (WHO, 2025).

A pirazinamida (PZA) é um dos quatro fármacos administrados concomitantemente no tratamento de primeira linha contra TB (BRASIL, 2019; WHO, 2025). A PZA possui um papel fundamental na otimização do esquema terapêutico, promovendo o encurtamento de 9-12 meses para 6 meses decorrente da sua atividade esterilizante em pH 4,8 a 5,0 contra *Mtb* (HEIFETS *et al*., 1992).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia Médica, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), vem realizando estudos *in vitro* de uma substância pertencente a uma classe de *N*-salicilhidrazonas, nomeada SH18. Até o momento, foram realizados alguns ensaios *in vitro* e testes *in silico* para avaliar a atuação da substância em *Mtb* que demonstraram resultados, como: os índices de seletividade (IS) contra 3 linhagens celulares distintas (IS J774.A1=4.205, IS MRC-5=472, IS VERO=455); a concentração inibitória mínima (CIM) baixa contra a cepa padrão $H_{37}Rv$; probabilidades elevadas de não causar irritabilidade, mutações e tumores e baixa probabilidade de toxicidade reprodutiva; potencial de absorção pelo trato gastrointestinal elevado e de alta probabilidade de permeabilidade da barreira hematoencefálica, dentre outros (IEQUE *et al*., 2024).

Dessa forma, o objetivo do projeto foi continuar os testes pré-clínicos *in vitro* realizando um estudo de combinação entre a PZA e a SH18, visando avaliar a interação entre ambas as substâncias.

MATERIAIS E MÉTODOS

A interação da SH18 com o fármaco anti-*Mtb* PZA foi avaliada pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA), com alterações (CALEFFI-FERRACIOLI *et al*., 2013). A cepa $H_{37}Rv$ de *Mtb* foi cultivada em caldo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (Ácido oleico, Albumina, Dextrose e Catalase) com pH neutro (~6,8) durante 15-21 dias. O meio utilizado durante o ensaio teve seu pH ajustado para 6,0.

A microplaca foi incubada por 7 dias, em estufa a 37ºC. Após este período, a placa foi revelada com 30 µL de resazurina 0,02% e incubada novamente. A leitura foi realizada após 24-48h, utilizando o fluorímetro (Thermo Scientific Varioskan LUX) ao qual a menor concentração de fármaco com uma redução de 90% na fluorescência da resazurina, foi considerada concentração inibitória mínima. Após a leitura dos resultados, os dados foram processados no *software* GraphPad Prism 8.0.1 e o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI, do inglês *Fractional Inhibitory Concentration Index*) e o Fator Modulador (FM) foram calculados de acordo com as equações abaixo:

$$FM = \frac{CIM\ A}{CIM\ A + CIM\ B} \qquad FICI = \frac{CIM\ A + CIM\ B}{CIM\ A} + \frac{CIM\ B + CIM\ A}{CIM\ B}$$

Legenda: CIM A: concentração inibitória mínima da substância A, que representa PZA; CIM B: concentração inibitória mínima da substância B, que representa SH18.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio foi realizado em duplicata e os resultados da análise fluorimétrica foram processados no *software* GraphPad Prism 8.0.1. A figura 1 mostra os resultados de como SH18 combinado influenciou a MIC da PZA (1a) e como a PZA influencia a MIC de SH18 (1b). A partir destes dados processados, foi calculado o FICI e FM das substâncias. Todos os resultados estão agrupados na Tabela 1.

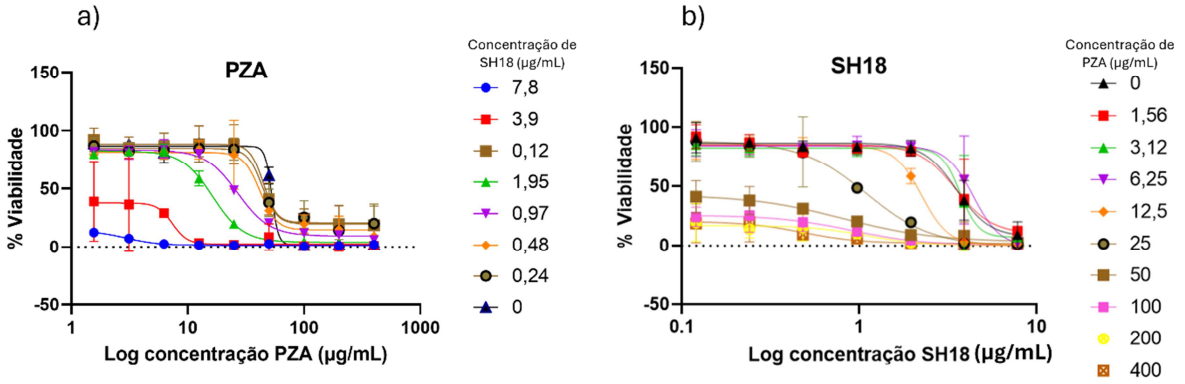


Figura 1. Curvas de dose-resposta da combinação de pirazinamida e *N*-salicilhidrazona (SH18) contra *Mycobacterium tuberculosis* por ensaio de *checkerboard* bidimensional em pH acidificado (pH 6,0). A viabilidade trata-se da viragem de fluorescência da resazurina em resorufina (fluorescente). 1a) Dose resposta da influência de SH18 sobre a pirazinamida. 1b) Dose resposta da influência da pirazinamida sobre a SH18. PZA: Pirazinamida. SH18: *N*-salicilhidrazona (SH18).

Tabela 1. Leitura da concentração inibitória mínima de pirazinamida e *N*-salicilhidrazona (SH18) contra *Mycobacterium tuberculosis* por ensaio de *chekerboard* bidimensional em pH acidificado

CIM (µg/mL)				FM PZA	FICI
PZA	**SH18**	**PZA+SH18**	**SH18+PZA**		
60,9	5,7	31,9	2,8	1,9	0,99

Legenda: CIM: concentração inibitória mínima; FM: fator modulador para pirazinamida; FICI: índice de concentração inibitória fracionada.

O valor de FICI fornece a interpretação da interação entre as duas substâncias como: sinergismo FICI≤0,5; indiferença/adição 0,5>FICI≤4; antagonismo FICI>4. Foi observado que a interação de PZA e SH18 mostrou atividade aditiva (0,5>FICI≤4) e modulação (FM) 1,9 vezes a CIM de PZA por SH18.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a interação entre a PZA e a SH18 apresentou efeito aditivo sobre o efeito na CIM de PZA, e que o a acidificação não contribui para a atividade de SH18, mesmo que para atividade frente a um fármaco que depende de tal condição como a PZA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UEM, à Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) e à Fundação Araucária pelo apoio e pela concessão da bolsa de iniciação científica. Agradeço também à minha orientadora, Profa. Regiane Bertin de Lima Scodro, pela orientação, dedicação e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose**. Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tuberculose. Acesso em: 6 ago. 2026.

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. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/tuberculose/manual-de-recomendacoes-e-controle-da-tuberculose-no-brasil-2a-ed.pdf/view. Acesso em: 6 ago. 2026.

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. Tuberculosis, Edinburgh, v. 93, n. 6, p. 660-663, nov. 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.09.001.

HEIFETS, L.; LINDHOLM-LEVY, P. Pyrazinamide Sterilizing Activity *In Vitro* against Semidormant *Mycobacterium tuberculosis* Bacterial Populations. **American Review of Respiratory Disease**, v. 145, n. 5, p. 1223–1225, 1992. DOI: https://doi.org/10.1164/ajrccm/145.5.1223

IEQUE, A. L. *et al*. Preclinical tests for salicylhydrazones derivatives to explore their potential for new antituberculosis agents. **Tuberculosis** (Edinburgh, Scotland), v.148, p. 102545, set. 2024.DOI: https://doi.org/10.1016/j.tube.2024.102545

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2025**. Geneva: World Health Organization, 2025. Disponível em: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/e97dd6f4-b567-4396-8680-717bac6869a9/content. Acesso em: 21 ago. 2026.