



PREDIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE UM DERIVADO 3,5- DINITROBENZOILHIDRAZONA POR MODELO *IN SILICO*

Gabriella L. Bonone^{1*}, Maria Luiza Froes da Motta Dacome¹, Jean Eduardo Meneguello¹, Regiane Bertin de Lima Scodro¹, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli¹, Rosilene Fressatti Cardoso¹

¹Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, Brasil.

*bononegabriella@gmail.com

Área Temática: Doenças infecciosas e parasitárias

Resumo

O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente causador da tuberculose (TB), uma doença infecciosa que atinge principalmente os pulmões, podendo se disseminar para outros órgãos. A transmissão ocorre por via aérea, e o tratamento é complexo, especialmente devido à resistência a múltiplos fármacos utilizados, que o torna mais oneroso ao paciente e sistemas de saúde. Nos últimos 20 anos, o grupo de pesquisa do Laboratório de Micobactérias da Universidade Estadual de Maringá, tem explorado substâncias com atividade antimicobacteriana, incluindo o derivado 3,5- dinitrobenzoilhidrazona, *hit-17*. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antimicobacteriano e antituberculose do *hit-17 in silico* e *in vitro*. Utilizando a plataforma Way2Drug, os dados *in silico* mostraram que o *hit-17* possui potencial antituberculoso e antimicobacteriano de 48,7% e 43,4%, respectivamente. *In vitro*, as cepas *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 e *Mycobacterium smegmatis* mc²155 foram utilizadas para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Para o *M. smegmatis*, o CBM foi equivalente à CIM (16µg/mL), sugerindo que a concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano é também suficiente para induzir a morte bacteriana em 99.9%. Os resultados indicam que o *hit-17* demonstrou atividade bactericida em baixas concentrações contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium smegmatis*, apontando para o potencial do composto como um candidato promissor no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da tuberculose e de infecções causadas por MNTs.

Palavras-chave: 3,5-dinitrobenzoilhidrazona; *in silico*; *Mycobacterium tuberculosis*.

Introdução

O *Mycobacterium tuberculosis* é a bactéria responsável pela tuberculose (TB), uma das doenças infecciosas mais graves e letais no mundo. A TB afeta predominantemente os pulmões, mas pode se disseminar para outros órgãos, causando uma variedade de sintomas (WHO, 2023). A transmissão ocorre principalmente por via aérea, através de aerossóis expelidos quando uma pessoa infectada tosse ou espirra (Fennelly, K. P., & Jones-López, E. C. (2015)). O tratamento da TB é desafiador devido à longa duração e complexidade do regime medicamentoso, especialmente em face do surgimento de cepas resistentes a múltiplos medicamentos. Devido às dificuldades de manipulação de *M. tuberculosis*, sugere-se uma investigação paralela da atividade de fármacos antituberculose em modelo experimental substituto (do inglês *surrogate*) de *Mycobacterium smegmatis*, um saprófita que *in vitro* pode simular aspectos da fisiologia do *M. tuberculosis*



(Kana, B.D., and Mizrahi, V. (2010). A descoberta de novos fármacos para o tratamento da TB é uma prioridade urgente em saúde global. A resistência antimicrobiana não só dificulta o tratamento como também prolonga a doença e aumenta o risco de disseminação (Dheda, K., *et al.*, 2017). Novos medicamentos com regimes de tratamento mais curtos, menos efeitos colaterais e maior eficácia contra cepas resistentes podem representar avanços significativos na luta contra a tuberculose. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem explorado nos últimos 20 anos o potencial de várias substâncias naturais e moléculas sintéticas com atividade antimicobacteriana, dentre elas um derivado 3,5-dinitrobenzoilhidrazona, denominado *hit-17*, que vem se destacando em ensaios *in silico* e *in vitro*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicobacteriano do *hit-17 in silico*, bem como avaliar se o mesmo exerce ação bactericida em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, através de modelos *in vitro*.

Materiais e métodos

Análise in silico

Considerando aspectos estruturais, o SMILES da molécula *hit-17* foi analisado na plataforma way2drug, quanto ao seu potencial de atividade antimicobacteriana e anti *M. tuberculosis*.

Cepas de referência M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 e Mycobacterium smegmatis mc²155

Foram utilizadas neste estudo as cepas de referência *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, e *M. smegmatis* mc² 155, provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da UEM. As cepas de referência foram semeadas em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase - DifcoLaboratories, Detroit, USA) e Caldo Mueller Hinton, e incubadas por 3 e 15 dias a 37°C respectivamente.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv, o ensaio foi realizado a partir de um cultivo de 10- 15 dias a 37°C, que foi padronizado de acordo com a escala 1 de McFarland e diluído 1:20. Já para a cepa *M. smegmatis* mc² 155, um cultivo de 3 dias, foi padronizado de acordo com a escala 0,5 de McFarland e diluído a 1:200. A molécula *hit-17* foi diluída seriadamente em placas de 96 poços, para obter uma faixa de concentração de 256- 0,25 µg/mL para ambas as espécies microbianas. Em seguida, os inóculos diluídos, foram adicionados às placas e incubados por 7 e 3 dias a 35-37°C, respectivamente (Palomino, J.C., *et al.* (2002). Depois, 30 µL de solução de resazurina a 0,02% foram adicionados a cada poço e as placas foram reincubadas por 24 h a 35-37°C. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de impedir a mudança da cor da resazurina de azul (estado oxidado) para rósea (estado reduzido) e, portanto, inibir o crescimento bacteriano.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima em estado replicativo (CBM)

Após determinar a CIM, todo o conteúdo dos poços anteriores a CIM, a CIM, e dois poços após a CIM e o controle positivo foram homogeneizados em, vórtex, e o controle positivo foi diluído quatro ordens de magnitude (-1, -2, -3, -4). Após as diluições, alíquotas de 50 µL foram plaqueadas em ágar Middlebrook 7H11 suplementado com OADC. As placas foram incubadas por 21 dias para *M. tuberculosis* e 5 dias para *M. smegmatis*, para posterior contagem de colônias. O endpoint, valor considerado os 99,9% de morte bacteriana, foi calculado utilizando os valores da Concentração inoculada (UFC/mL) X Alíquota plaqueada (mL) X



0,001 (0,1%).

Resultados e discussão

O potencial antituberculose e antimicobacteriano do *hit-17* avaliado *in silico* foi 48,7% e 43,4%, respectivamente. Tal dado, embasou a testagem *in vitro* da atividade do *hit 17*, que apresentou uma CIM de 16 µg/mL para *M. smegmatis* mc² 155 e 4 µg/mL para *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Considerando os valores de endpoint calculados para *M. smegmatis* mc² 155 e *M. tuberculosis* H₃₇Rv. o *hit-17* comportou-se como uma molécula de efeito bactericida, com CBM de 16 para ambas as espécies testadas (tabela 1).

Tabela 1. Contagem de UFC/mL em cada concentração de hit-17 para determinação do MBC.

<i>M. smegmatis</i>			<i>M. tuberculosis</i>		
Concentração	CFU/plate	>= 99,9%	Concentração	CFU/plate	>=99,9%
256	7	YES	256	0	YES
128	5	YES	128	0	YES
64	4	YES	64	0	YES
32	3	YES	32	0	YES
16(MIC)	8	YES	16	0	YES
8	UC	NO	8	51	NO
4	UC	NO	4(MIC)	140	NO
			2	UC	NO
			1	UC	NO

Conclusões

O *hit-17* demonstrou potencial atividade antimicobacteriana *in silico*, confirmada por sua atividade bactericida *in vitro*, a qual baixas concentrações da molécula foram bactericidas contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv e *M. smegmatis* mc² 155. Especificamente, para *M. smegmatis*, o CBM foi equivalente a CIM, o que sugere que a concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano é também suficiente para induzir a morte das células bacterianas. Estes achados apontam para o potencial do *hit-17* como um candidato promissor no seguimento dos estudos pré-clínicos, com vistas ao desenvolvimento de um novo agente terapêutico para o tratamento da tuberculose e de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Código de Financiamento 001.

Referências

DHEDA, K.; GUMBO, T.; MAARTENS, G.; *et al.* The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 5, n. 4, p. 291-360, 2017.

FENNELLY, K. P.; JONES-LÓPEZ, E. C. The relationship between *Mycobacterium tuberculosis* in exhaled breath aerosol and sputum smear positivity. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.



KANA, B. D.; MIZRAHI, V. Rescuing of *Mycobacterium smegmatis* as a model system for tuberculosis drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11-12, p. 457-465, 2010.

PALOMINO, J. C.; *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Tuberculosis Report 2023. Geneva: **WHO**, 2023.