

## TRIAGEM BIOLÓGICA DE COMPOSTOS HÍBRIDOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS A AGENTES MICOBACTERICIDAS

Henrique de Oliveira Pinto<sup>1</sup>, Rennan Batista Dias<sup>1</sup>, Luiz Guilherme Schmidt Castellani<sup>1</sup>, Kássia Vidal Menezes<sup>1</sup>, Pedro Alves Bezerra Morais<sup>2</sup>, Moisés Palaci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas, Maruípe, Av. Mal. Campos, 1468, 29047-10 - Vitória -ES. @farma.henriqueoliveira@gmail.com, rennan\_bd@hotmail.com, luizguisc@gmail.com, kassiavmenezes@gmail.com, mpalaci@ndi.ufes.br

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre – ES, Brasil. pedmora2005@gmail.com

### Resumo

A tuberculose (TB), é uma doença que causa danos significativos devido à crescente resistência aos antibióticos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) a considera prioritária para erradicação, impulsionando projetos de pesquisa com novos compostos. Nesse contexto, compostos antituberculose têm sido testados, incluindo derivados azólicos e ácido cafeico. Este estudo avaliou 11 compostos híbridos de derivados azólicos (CHDA) e 5 derivados do ácido cafeico (CDAC) quanto à atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) por meio de microdiluição em caldo. O processo consistiu em preparar microplacas com estruturação específica, inoculá-las com cepas de referência e avaliar o crescimento bacteriano. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 16 µg/mL foram observadas em 4 compostos híbridos para cepas H37Ra e H37Rv, não sendo observada CIM para cepas resistentes a rifampicina e isoniazida. Apenas os poços contendo H21 e H66 apresentaram CIM (256 µg/mL) para cepas H37Ra e H37Rv. Comparados com fármacos azólicos, os 4 compostos híbridos mostram promissora inibição, indicando potencial para pesquisas futuras. A busca por novos compostos antituberculose é vital diante da resistência crescente, e esses resultados destacam compostos que merecem mais investigação.

**Palavras-chave:** Tuberculose; Híbridos azólicos; Derivados do ácido cafeico; Concentração Inibitória Mínima.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas – Microbiologia

### Introdução

A TB é uma doença infecciosa, transmissível, que acomete principalmente o trato respiratório e está classificada como um sério desafio global de saúde pública, devido as taxas de morbidade e mortalidade significativas em todo o mundo (SIA; RENGARAJAN, 2019; ZUMLA *et al.*, 2013). A TB pode ser causada por qualquer uma das 10 espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (AZÉ *et al.*, 2015). A espécie mais visada no que diz respeito à saúde pública é MTB, também chamada de bacilo de Koch. MTB é muito característico por ser um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) fino e ligeiramente curvo, além de ser aeróbio obrigatório e apresentar uma parede celular rica em lipídios de membrana, como os ácidos micólicos e o arabinogalactano, o que resulta em uma baixa permeabilidade e acaba reduzindo a ação da maioria dos antibióticos (KANABALAN *et al.*, 2021).

Entre 2019 e 2020 a OMS estimou cerca de 5,8 milhões de novos casos espalhados pelo mundo e, destes, 1,3 milhão de pessoas morreram devido à doença em 2020. Em 2021 há piora desse cenário, com aproximadamente 10,6 milhões de casos sendo aproximadamente 450.000 de TB resistentes à rifampicina ou multirresistentes (MDR-TB) (PEETLUK *et al.*, 2020). O aumento da resistência a drogas antiTB tem dois principais fatores, a seleção de populações resistentes advindas de tratamento irregular ou inadequado e da própria mutação espontânea de MTB, no entanto, várias mutações genéticas

podem alterar proteínas ou estruturas dentro do próprio bacilo, culminando num aumento de cepas resistentes (NGUYEN *et al.*, 2018).

Compostos azólicos destacam-se na era pós genômica, tais substâncias apresentam alta ação inibitória frente ao MTB em condições aeróbicas, bactérias em estágio não replicativo ou em condições de hipóxia (CONCEIÇÃO, 2013). O ácido cafeico é um composto fenólico abundante na natureza, envolvido na biossíntese da lignina. Estudos mostraram que ele pode inibir o crescimento de MTB, com uma CIM moderada entre 128 e 512 µg/mL para isolados clínicos e 256 µg/mL para a cepa de referência MTB H37Ra. Além disso, o ácido cafeico demonstrou capacidade de inibir outros microrganismos, como *Oenococcus oeni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e algumas leveduras (CAMPOS *et al.*, 2003; DEY *et al.*, 2015).

Visto o cenário atual e a urgência de desenvolvimento de novos antimicrobianos, estratégias e pesquisas em novos meios de detecção e de tratamento contra MTB e MDR-TB devem ser intensificadas para reduzir os impactos da TB em âmbito mundial (WHO, 2015). Os objetivos deste trabalho foram Avaliar a ação *in vitro* de CHDA e de CDAC contra MTB. Especificamente, buscou-se verificar a eficácia de 11 CHDA e 5 CDAC quanto à atividade contra MTB por meio de microdiluição em caldo.

## Metodologia

Este estudo experimental foi projetado para avaliar a sensibilidade de diferentes substâncias contra MTB. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Micobacteriologia do NDI na UFES e dividida em três etapas principais: preparação das microplacas, inoculação das cepas e leitura dos resultados.

Na primeira etapa, microplacas contendo os compostos a serem testados foram preparadas seguindo uma estruturação pré-definida. (Figura 1 e Figura 2). Os CHDA e os CDAC, sintetizados pelo Laboratório de Química da UFES, foram armazenados em soluções preparadas com dimetilsulfóxido (DMSO) e conservados a -80°C para garantir a integridade durante o experimento (Tabela 1). Além disso, foram utilizados dois antimicrobianos de referência, a Rifampicina e a Linezolida, adquiridos da farmacêutica Sigma-Aldrich. Estas substâncias serviram como controles para comparação da eficácia dos compostos testados.

Tabela 1 – Siglas e nomenclatura dos compostos testados.

	SIGLAS					
<b>COMPOSTOS HIBRIDOS TRIAZÓLICOS</b>	FLAV03	RAYMA13	RAYMA32	RAYMA34	RAYMA40	RAYMA41
	RAYMA43	RAYMA48	RAYMA49	RAYMA54	RAYMA55	
<b>COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO CAFEICO</b>	H21	H46	H51	H61	H66	

Fonte: De autoria própria

A segunda etapa do experimento envolveu a inoculação das microplacas com cepas de referência do MTB. Essas cepas foram escolhidas devido à sua relevância no contexto de MDR-TB, que é caracterizada pela resistência à Rifampicina e Isoniazida, representando um dos maiores desafios no tratamento da doença. As cepas foram cultivadas em meio Ogawa-Kudoh e incubadas a 37°C por um período que variou entre 21 e 28 dias, até que atingissem o crescimento adequado para a fase de inoculação.

Para garantir a precisão dos resultados, as placas foram preparadas com uma diluição seriada das substâncias. CIM foi determinada de acordo com padrões estabelecidos pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Para os compostos azólicos de referência, as concentrações variaram entre 0,03µg/mL e 2µg/mL, enquanto para os CDAC, foram adotadas concentrações que iam de 256 µg/mL a 4 µg/mL, com base em estudos anteriores. A microplaca foi disposta de maneira que permitisse a comparação direta entre o crescimento bacteriano em presença dos compostos e os controles positivo e negativo. O controle positivo continha MTB sem antimicrobianos, para assegurar que as

condições de crescimento eram adequadas, enquanto o controle negativo continha apenas o meio de cultura, sem MTB, para garantir a ausência de contaminações.

Figura 1 – Esquema representando o conteúdo dos poços da microplaca 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LZN 2 µg/mL	RIF 2 µg/mL	FLAV03 16 µg/mL	RAYMA 13 16 µg/mL	RAYMA 34 16 µg/mL	RAYMA 40 16 µg/mL	RAYMA 32 16 µg/mL	RAYMA 41 16 µg/mL	RAYMA 48 16 µg/mL	RAYMA 49 16 µg/mL	CC1	CN
B	1 µg/mL	1 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	CC2	CN
C	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	CC3	CN
D	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	CC4	CN
E	0,12 µg/mL	0,12 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	CC5	CN
F	0,06 µg/mL	0,06 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	CC6	CN
G	0,03 µg/mL	0,03 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	CC7	CN
H	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CC8	CN

LZN: Linezolida, em azul forte; RIF: Rifampicina, em vermelho; CC1-CC8: controles dos compostos, em amarelo escuro; CN: controle negativo, em cinza; CP: controle positivo, em verde. Os poços de teste dos CHDA estão destacados em amarelo claro.

Fonte: De autoria própria.

Figura 2 – Esquema representando o conteúdo dos poços da microplaca 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LZN 2 µg/mL	RIF 2 µg/mL	RAYMA43 16 µg/mL	RAYMA 54 16 µg/mL	RAYMA 55 16 µg/mL	H46 256 µg/mL	H51 256 µg/mL	H61 256 µg/mL	H66 256 µg/mL	H21 256 µg/mL	CC1	CN
B	1 µg/mL	1 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	CC2	CN
C	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	CC3	CN
D	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	CC4	CN
E	0,12 µg/mL	0,12 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	CC5	CN
F	0,06 µg/mL	0,06 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	CC6	CN
G	0,03 µg/mL	0,03 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	CC7	CN
H	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CC8	CN

LZN: Linezolida, em azul forte; RIF: Rifampicina, em vermelho; CC1-CC8: controles dos compostos, em amarelo escuro e azul escuro; CN: controle negativo, em cinza; CP: controle positivo, em verde. Os poços de teste dos CHDA estão destacados em amarelo claro e os dos CDAC estão destacados em azul claro.

Fonte: De autoria própria.

A terceira e última etapa consistiu na leitura dos resultados. As microplacas foram inspecionadas em intervalos regulares (7, 10, 14, 21 e 28 dias) usando um espelho para avaliar a turbidez em cada poço, indicando o crescimento bacteriano.

O crescimento foi comparado com os controles para determinar se os compostos testados inibiram efetivamente o MTB em diferentes concentrações. A metodologia utilizada seguiu rigorosamente os protocolos de controle de qualidade, incluindo a preparação do inóculo bacteriano ajustado para uma turbidez 0,5 na escala McFarland, diluições seriadas e plaqueamento em ágar para verificar a consistência do inóculo.

## Resultados

Nos testes realizados, a maioria dos CHDA não conseguiu inibir o crescimento bacteriano, sugerindo que suas CIM são superiores a 16 µg/mL. Contudo, inibição foi observada nos compostos FLAV 03 e RAYMA 41 para a cepa H37Ra, e nos compostos RAYMA 55 e RAYMA 43 para a cepa H37Rv, todos com CIM de 16 µg/mL. Não houve inibição para as cepas resistentes RIF-R e INH-R. (Tabela 2).

Tabela 2 – CIM dos compostos híbridos de derivados azólicos.

Compostos	CIM			
	Cepas			
	H <sub>37</sub> Ra	H <sub>37</sub> Rv	RIF-R	INH-R
FLAV 03	16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 13	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 34	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 40	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 32	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 41	16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 48	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 49	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 54	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 55	>16 µg/mL	16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL
RAYMA 43	>16 µg/mL	16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL

Fonte: De autoria própria

Nos CDAC, apenas os compostos H21 e H66 mostraram inibição, com CIM de 256 µg/mL para as cepas H37Ra e H37Rv, enquanto as demais cepas não foram inibidas. Isso sugere uma atividade limitada e específica desses compostos (Tabela 3).

Tabela 3 – CIM dos compostos derivados do ácido cafeico.

Compostos	CIM			
	Cepas			
	H <sub>37</sub> Ra	H <sub>37</sub> Rv	RIF-R	INH-R
H21	256 µg/mL	256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL
H46	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL
H51	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL
H61	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL
H66	256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL

Fonte: De autoria própria

Os controles de qualidade foram aprovados, e as leituras das placas indicaram que Linezolida e Rifampicina mantiveram a eficácia esperada, com exceção da Rifampicina contra a cepa RIF-R, como esperado. Essas observações indicam que, embora alguns compostos apresentem atividade antimicrobiana, são necessárias concentrações elevadas, especialmente nos derivados do ácido cafeico.

## Discussão

Neste estudo, a maioria dos compostos testados não demonstrou CIM eficaz contra as cepas de MTB utilizadas, indicando que a CIM é superior às concentrações testadas. Contudo, alguns híbridos

azólicos (FLAV 03, RAYMA 41, RAYMA 55 e RAYMA 43) apresentaram CIM em 16 µg/mL. Comparando esses compostos com fármacos azólicos da literatura, suas atividades foram semelhantes, com nitroimidazólicos como metronidazol e ipronidazol demonstrando atividades em concentrações comparáveis (IMPERIALE *et al.*, 2017).

Os métodos *in vitro* utilizados não são totalmente confiáveis para prever a eficácia *in vivo*, especialmente sem dados farmacológicos dos compostos testados. Os valores de CIM encontrados são, portanto, preliminares e servem para orientar futuras pesquisas. As substâncias Rifampicina e Linezolida foram usadas como controle e todas as cepas, exceto uma resistente à Rifampicina, mostraram-se sensíveis a elas, conforme os padrões estabelecidos. A semelhança dos resultados com compostos estudados anteriormente sugere que esses CHDA merecem mais investigações, particularmente em relação a suas modificações estruturais e suas possíveis melhorias nas propriedades antimicobacterianas.

No caso dos CDAC, poucos dados comparativos estão disponíveis. O ácido cafeico demonstrou uma atividade inibitória moderada contra MTB, com CIM variando de 128 a 512 µg/mL. Os CDAC testados, como H21 e H66, apresentaram CIM em 256 µg/mL, o que não representa uma melhora significativa em relação ao ácido cafeico. Dessa forma, esses compostos não se mostram promissores como novos agentes antimicobacterianos. Ainda assim, os resultados não podem ser extrapolados para a eficácia *in vivo*, uma vez que não foram analisadas correlações entre sensibilidade *in vitro* e resposta ao tratamento.

Em resumo, os resultados com CHDA são encorajadores e sugerem que mais estudos são necessários, especialmente focados em modificações estruturais que possam melhorar suas propriedades antimicobacterianas e farmacológicas. Esses achados preliminares contribuem para futuras pesquisas que busquem otimizar a eficácia desses compostos no combate à tuberculose.

## Conclusão

Alguns CHDA e CDAC demonstraram ação *in vitro* contra o MTB. Entre os compostos testados, quatro CHDA apresentaram CIM semelhante à de alguns fármacos azólicos já citados na literatura, indicando boas perspectivas para futuras pesquisas. Em contraste, dois compostos derivados do ácido cafeico também mostraram ação *in vitro* contra MTB, porém em concentrações elevadas, o que os torna menos promissores para desenvolvimento farmacológico.

## Referências

AZÉ, J *et al.* Genomics and Machine Learning for Taxonomy Consensus: The Mycobacterium tuberculosis Complex Paradigm. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-24, 2015.

CAMPOS, F. M. *et al.* Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **J. Appl. Microbiol.** v. 94, n. 2, p. 167–174, fev. 2003.

DEY, D. *et al.* Polyphenolic Secondary Metabolites Synergize the Activity of Commercial Antibiotics against Clinical Isolates of  $\beta$ -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Phytother Res.**, v. 30, n. 2, p. 272–282, 14 dez. 2015b.

CONCEIÇÃO, G. R. **TB, Novos Desafios**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013, p. 46.

CLSI. **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018

IMPERIALE, B R *et al.* In vitro anti-tuberculosis activity of azole drugs against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **Rev Argent Microbiol.** v. 49, ed. 4, p. 332-338, 2017.

KANABALAN, R. D. *et al.* Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: a review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. **Microbiological Research**, v. 246, p. 1-18, 2021.

NGUYEN, Q.H. *et al.* Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Evol Appl.** v. 11, n. 9, p. 1498-1511, 2018.

PEETLUK, L.S. *et al.* Lack of Weight Gain During the First 2 Months of Treatment and Human Immunodeficiency Virus Independently Predict Unsuccessful Treatment Outcomes in Tuberculosis. **J Infect Dis.** v. 221, n. 9, p. 1416-1424, 2020.

SIA, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, p. 1-37, 2019.

WHO. **Global tuberculosis report 2022**. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>>. Acesso em: 17 jul. 2024

WHO. **The End TB Strategy**. Geneva, 2015. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-TB-2015.19>>. Acesso em: 02 fev 2024

### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da UFES, a FAPES (Edital Universal 03/2021; Projeto 428/2021) e CNPq.