

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Leonardo de Aquino Linhares

Atividade antimicobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e etambutol contra *Mycobacterium tuberculosis* Multidroga Resistente

Recife
2021

Leonardo de Aquino Linhares

Atividade antimicobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e etambutol contra *Mycobacterium tuberculosis* Multidroga Resistente

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Haiana Charifker Schindler.

Coorientadora: Dra. Lilian Maria Lapa Montenegro.

Recife

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- L755a Linhares, Leonardo de Aquino.
Atividade Antimicobacteriana In Vitro de Análogos da diidroesfingosina e etambutol contra Mycobacterium tuberculosis Multidroga Resistente / Leonardo de Aquino Linhares. — Recife: [s.n.], 2021.
94 p. : il., tab. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.
Orientadora: Haiana Charifker Schindler;
coorientadora: Lilian Maria Lapa Montenegro.
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.
1. Mycobacterium tuberculosis - efeitos de fármacos. 2. Tuberculose - tratamento farmacológico. 4. Concentração Inibitória Mínima. 5. Amino álcoois. 6. Sinergismo farmacológico. 7. Simulação de acoplamento molecular. 8. Antituberculosos - farmacologia. 9. Antituberculosos - uso terapêutico. 10. Desenho de drogas. 11. Sensibilidade e especificidade. 12. Técnicas In Vitro. I. Schindler, Haiana Charifker. II. Montenegro, Lilian Maria Lapa. III. Título.

Leonardo de Aquino Linhares

Atividade antimicobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e etambutol contra *Mycobacterium tuberculosis* Multidroga Resistente

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Aprovado em: 30 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Haiana Charifker Schindler

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Valéria Pereira Hernandez

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Fábio Rocha Formiga

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Amanda Rafaela Carneiro de Mesquita

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Thiago Henrique Napoleão

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha mãe (*in memoriam*),
por ter despertado em mim o gosto e
curiosidade pelas ciências da saúde.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar nos momentos que duvidei da minha força em superar dificuldades. Por colocar pessoas na minha vida e a partir delas poder aprender a escolher seguir ou não seus exemplos.

Agradeço à minha mãe Ana, mesmo com sua partida tão precoce, por todo o amor, cuidado e ensinamento. Principalmente por me ensinar a ter empatia nas ações e nas palavras. Agradeço ao meu pai, Florivaldo, e a minha irmã, Mariana, pelo suporte, companheirismo, orientação e estímulo a seguir no melhor caminho.

Agradeço às minhas orientadoras, Dra. Haiana e Dra. Lílian, que me deram a oportunidade a ingressar no grupo de pesquisa com tuberculose. Agradeço por apostar e confiar em desenvolver um projeto de pesquisa a partir do zero. E por isso agradeço por terem lutado em resolver tantos percauços estruturais que surgiram no meio do caminho. Agradeço principalmente pelo ensinamento, pela paciência, respeito e os saudosos momentos de comemoração com todos do laboratório.

Obrigado a toda a equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia pelo suporte, aprendizado e momentos de café e sobremesas. Obrigado por deixarem o ambiente sempre leve, mesmo com a luta em fazer qualquer experimento dar certo. Agradeço, principalmente ao suporte de Yuri, Aline, Luanna e João Paulo que entraram para dar continuidade a linha de pesquisa.

Obrigado aos colaboradores do projeto: professor Arturo, professor Antônio Neves, professor Marcelo Zaldini, Felipe Felzrt e Aline Caroline.

Agradeços à Fabiana, Marcela e Aline por todos os momentos de amizade que o tempo no Aggeu proporcionou. Teria sido muito mais difícil seguir sem vocês!

Obrigado a todos os meus amigos, de longa ou nova data, que surgiram e permaneceram comigo. Obrigado por tantos momentos incríveis e pela paciência em esperar por mim!

RESUMO

LINHARES, Leonardo de Aquino. **Atividade antimicobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e etambutol contra *Mycobacterium tuberculosis* multidroga resistente**. 2021. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

A tuberculose permanece como um importante problema de saúde pública e uma das dez principais causas de morte no mundo. Somado a isto, o preocupante aumento de casos de variantes multidroga resistentes e extremamente resistentes (MDR, pre-XDR e XDR) torna a doença mais difícil de ser tratada e controlada. Novas drogas que atuem contra cepas MDR, que possam ser utilizadas de modo a encurtar o esquema terapêutico, bem como facilitar a sua administração são necessárias para os programas de contenção dessa epidemia. O objetivo do presente estudo foi avaliar novos compostos relacionados a diidroesfingosina e ao etambutol contra cepas micobacterianas sensíveis e pré-XDR, bem como caracterizar a atividade biológica através de abordagens *in vitro* e *in silico*. Dos 48 compostos analisados, 11 demonstraram boa a moderada atividade em *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) sensível e pré-XDR, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando entre 1,5 a 8 µM. Apresentaram 2 a 14 vezes maior potência de atividade quando comparados ao etambutol, em cepa pré-XDR e demonstraram índice de seletividade variando entre 2,21 e 82,17. Observamos também boa a moderada atividade em *M. smegmatis* e *Staphylococcus aureus*. A substância o-12 quando combinada com rifampicina, demonstrou efeito sinérgico (FICI = 0,5) em *Mtb* sensível e pré-XDR. Demonstrou ainda deter efeito bactericida intracelular dependente de concentração, e efeito bactericida dependente do tempo em *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* multiresistente. Através do docking molecular e utilizando um modelo estrutural preditivo da proteína mmpL3, foi possível identificar a interação dos compostos na cavidade da mesma. Por fim, observamos através da microscopia eletrônica de transmissão a indução de danos na integridade da parede celular do *M. tuberculosis* tratado com a substância o-12. Com esses achados demonstramos o potencial de um derivado 2-aminoalcanol em ser uma substância protótipo e candidato à continuação de otimização da estrutura molecular e atividade anti-tubercular em estudos pré-clínicos.

Palavras chaves: *mycobacterium tuberculosis*; concentração inibitória mínima; amino álcoois; sinergismo farmacológico; simulação de acoplamento molecular.

ABSTRACT

LINHARES, Leonardo de Aquino. ***In vitro* antimycobacterial activity of dihydrosphingosine and ethambutol analogs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis***. 2021. Thesis (PhD in Biosciences and Biotechnology in Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Tuberculosis remains a major public health problem and one of the ten leading causes of death worldwide. In addition, the worrying increase in cases of multidrug resistant and extremely resistant variants (MDR, pre-XDR and XDR) makes the disease more difficult to treat and control. New drugs that act against MDR strains, that can be used in order to shorten the therapeutic regimen, as well as facilitate their administration, are necessary for programs to contain this epidemic. The aim of the study was to evaluate new compounds related to dihydrosphingosine and ethambutol against sensitive and pre-XDR mycobacterial strains, as well as to characterize the biological activity through *in vitro* and *in silico* approaches. Of the 48 compounds analyzed, 11 showed good to moderate activity on sensitive and pre-XDR *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ranging from 1.5 to 8 μ M. They exhibited 2 to 14 times greater potency of activity when compared to ethambutol in pre-XDR strain and demonstrated selectivity index ranging from 2.21 to 82.17. We also observed good to moderate activity in *M. smegmatis* and *Staphylococcus aureus*. The substance o-12 when combined with rifampicin, demonstrated synergistic effect (FICI = 0.5) on sensitive and pre-XDR Mtb. It was also shown to have a concentration-dependent intracellular bactericidal effect, and a time-dependent bactericidal effect on *M. smegmatis* and multiresistant *M. tuberculosis*. Through molecular docking and using a predictive structural model of the mmpL3 protein, it was possible to identify the interaction of the compounds in its cavity. Finally, we observed by transmission electron microscopy the induction of damage in the cell wall integrity of *M. tuberculosis* treated with the substance o-12. With these findings we demonstrate the potential of a 2-aminoalkanol derivative to be a prototype substance and candidate for further optimization of molecular structure and anti-tubercular activity in preclinical studies.

Keywords: mycobacterium tuberculosis; minimal inhibitory concentration; amino alcohols; drug synergism; molecular docking simulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Base estrutural da pesquisa com correlação de fragmentos entre as moléculas de esfingolipídeos e etambutol..... | 16 |
| Figura 2 - Ilustrações do envelope celular micobacteriano. Na esquerda, demonstrando o aspecto tridimensional do envelope e suas camadas; à direita, detalhe da conformação e interação entre as macromoléculas constituintes da parede celular do <i>Mycobacterium</i> spp. | 19 |
| Figura 3 - Estrutura da arabinogalactana micobacteriana e as enzimas envolvidas na sua biossíntese. | 21 |
| Figura 4 - Representação esquemática do complexo enzimático Ácido Graxo Sintase II (FAS-II) na biossíntese de ácidos micólicos..... | 22 |
| Figura 5 - Inibição da biossíntese de ácido micólico pela isoniazida..... | 24 |
| Figura 6 - Estrutura química dos agentes de primeira linha no tratamento da tuberculose..... | 26 |
| Figura 7 - Estrutura química e bioativação da INH com formação do aduto responsável pela inibição da InhA. | 30 |
| Figura 8 - Estrutura geral de aminoalcanóis e alcanodiaminas. | 39 |
| Figura 9 - Estrutura geral de novos aminoalcanóis e alcanodiaminas..... | 40 |
| Figura 10 - Isobogramas representando a interação do tipo sinérgica dos compostos sintetizados com a Rifampicina, contra o <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. | 60 |
| Figura 11 - Influência dos derivados 2-aminoalcan-1-ol e alcanodiaminas na cinética de morte do <i>M. smegmatis</i> | 61 |
| Figura 12 – Dinâmica de ação do composto o-12 isolado e em combinação com rifampicina na cinética de morte do isolado clínico pré-XDR (1576) do <i>M. tuberculosis</i> | 63 |
| Figura 13 - Atividade antimicobacteriana intracelular do composto o-12, livre e associado, em macrófago J774 infectado com <i>M. smegmatis</i> | 64 |
| Figura 14 - Sobreposição das melhores soluções de docking para cada um dos compostos utilizados neste estudo no sítio ativo da proteína mmpL3..... | 67 |
| Figura 15 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Principais antimicobacterianos e doses recomendadas. | 27 |
| Tabela 2 - Compostos do tipo aminoalcanol (OA) e diaminas (AA) previamente sintetizados e estudados. | 40 |
| Tabela 3 - Série de compostos do tipo 2-aminoalcan-1-ol otimizados e sintetizados. | 40 |
| Tabela 4 - Série de compostos do tipo alcan-1,2-diamina otimizados e sintetizados. | 41 |
| Tabela 5 - Série de compostos do tipo 1-aminoalcan-2-ol otimizados e sintetizados | 41 |
| Tabela 6 - Atividade antimicobacteriana dos derivados do tipo 2-aminoalcan-1-ol frente a cepas de <i>M. tuberculosis</i> sensível e multirresistente expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), e citotoxicidade em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50). | 53 |
| Tabela 7 - Atividade antimicobacteriana dos derivados do tipo 1,2-alcanodiaminas frente a cepas de <i>M. tuberculosis</i> sensível e multirresistente expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), e citotoxicidade em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50). | 55 |
| Tabela 8 - Atividade antimicobacteriana dos derivados do tipo 1-aminoalcan-2-ol frente a cepas de <i>M. tuberculosis</i> sensível e multirresistente expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), e citotoxicidade em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50). | 56 |
| Tabela 9 – Avaliação de espectro antibacteriano de derivados 2-aminoalcan-1-ol e alcanodiaminas determinados através da concentração inibitória mínima. | 57 |
| Tabela 10 - Concentração inibitória fracionada resultante da interação <i>in vitro</i> dos compostos selecionados e antimicobacterianos de primeira e segunda linha em cepas de <i>M. tuberculosis</i> | 59 |
| Tabela 11 - Valores de score (ChemPLP) para as soluções de docking dos compostos sintetizados em seus respectivos isômeros R e S. | 66 |

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| ACP | Proteína Carreadora de Acila |
| AG | Arabinogalactana |
| CC ₅₀ | Concentração citotóxica que reduz cinquenta por cento da viabilidade celular |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| DSPH | Diidroesfingosina |
| EMB | Etambutol |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| INH | Isoniazida |
| InhA | Enoil-ACP redutase |
| KatG | Catalase-peroxidase |
| LACEN/PE | Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco |
| LJ | Löwenstein-Jensen |
| MNT | Micobactérias não tuberculosas |
| Msm | <i>Mycobacterium smegmatis</i> |
| Mtb | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NAG | N-acetil Glucosamina |
| NAM | Acido N-acetil Murâmico |
| OADC | Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PE _r | Potência de atividade relativa ao Etambutol em cepa resistente |
| PBPs | Proteínas Ligadoras de Penicilina |
| PG | Peptidoglicano |
| PZA | Pirazinamida |
| RMP | Rifampicina |
| S1P | Esfingosina 1-fosfato |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SM | Estreptomicina |
| SPH | Esfingosina |
| TB | Tuberculose |

| | |
|--------|---|
| TB-MDR | Tuberculose multidroga resistente |
| TB-XDR | Tuberculose Extensivamente Droga Resistente |
| TDO | Tratamento Diretamente Observado |
| TSA | Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos |
| TSD | Teste de Susceptibilidade às Drogas |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 | ASPECTOS GERAIS DAS MICOBACTÉRIAS..... | 17 |
| 2.2 | O ENVELOPE MICOBACTERIANO..... | 18 |
| 2.3 | TRATAMENTO..... | 24 |
| 2.3.1 | Regimes de tratamento antituberculose | 26 |
| 2.3.1.1 | Tuberculose sensível:..... | 27 |
| 2.3.1.2 | Tuberculose multidroga resistente..... | 28 |
| 2.3.2 | Drogas essenciais no tratamento: como elas funcionam? | 29 |
| 2.3.2.1 | Isoniazida (INH)..... | 29 |
| 2.3.2.2 | Rifampicina (RMP) | 30 |
| 2.3.2.3 | Pirazinamida (PZA) | 31 |
| 2.3.2.4 | Etambutol (EMB) | 32 |
| 2.4 | DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE DROGAS ANTI-TUBERCULOSE..... | 33 |
| 2.5 | ESFINGOANÁLOGOS COMO AGENTE TERAPÊUTICO | 34 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 37 |
| 4 | OBJETIVO | 38 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 38 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 38 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 5.1 | SÍNTESE DOS COMPOSTOS | 39 |
| 5.2 | TESTES <i>IN VITRO</i> | 42 |
| 5.2.1 | Microrganismos e meio de cultura bacteriano | 42 |
| 5.2.2 | Antimicrobianos de referência e drogas testes | 42 |
| 5.2.3 | Determinação de atividade antimicobacteriana <i>in vitro</i> | 43 |
| 5.2.4 | Determinação da citotoxicidade (CC₅₀) | 44 |
| 5.2.5 | Triagem de atividade antibacteriana | 45 |
| 5.2.6 | Determinação da interação farmacológica <i>in vitro</i> | 46 |
| 5.2.7 | Cinética de morte micobacteriana | 47 |
| 5.2.8 | Modelo <i>in vitro</i> de infecção | 48 |
| 5.3 | DOCKING MOLECULAR | 49 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 5.4 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO | 50 |
| 6 | RESULTADOS | 51 |
| 6.1 | ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E CITOTOXICIDADE..... | 51 |
| 6.1.1 | Espectro de atividade antibacteriana | 57 |
| 6.2 | AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> | 58 |
| 6.3 | CINÉTICA DE MORTE | 60 |
| 6.4 | ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA INTRACELULAR | 63 |
| 6.5 | ANCORAGEM MOLECULAR..... | 65 |
| 6.6 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO | 67 |
| 7 | DISCUSSÃO | 70 |
| 8 | CONCLUSÃO | 75 |
| | REFERÊNCIAS | 76 |
| | APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO | 90 |

1 INTRODUÇÃO

“Fui diagnosticado com tuberculose pulmonar apical e, portanto, concedei o direito de me descrever como inválido. Ninguém sabe nada sobre minha doença em casa, então controle a sua malícia habitual e não deixe escapar sobre isso em suas mensagens”. Trecho de uma carta escrita, em 1897, por Anton Chekhov ao seu irmão, na qual pedia para esconder a notícia de sua família. Chekhov foi um médico russo e escritor, acometido pela tuberculose no período pré-antibiótico em que a única alternativa de tratamento era a cirurgia torácica (VILAPLANA, 2017).

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), bacilo álcool-ácido resistente que afeta tipicamente os pulmões, mas que pode atingir qualquer órgão do corpo ocasionando a tuberculose extrapulmonar. A doença continua sendo um grande problema de saúde pública mundial, e nos últimos 5 anos lidera como uma das 10 principais causas de morte provocada por um único agente infeccioso e a nona causa de morte no mundo. No último relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) foi estimado 10 milhões de pessoas acometidas por TB ativa e 1,4 milhão foram a óbito durante o ano de 2019 (WHO, 2020).

No Brasil, a TB é uma das principais causas de morbimortalidade, com uma tendência de aumento preocupante durante 2016 a 2019. E, permanece entre os 30 países de alta carga para a TB, com notificação de 66.819 novos casos de TB e 4,5 mil óbitos pela doença em 2020. O estado de Pernambuco registrou uma taxa de incidência de 48,4 novos casos por 100 mil habitantes, maior que a taxa nacional (31,6/100 mil habitantes), e foi o segundo estado a apresentar maior coeficiente de mortalidade - 3,9 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2021; WHO, 2020).

O diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais para a eficácia dos programas públicos de controle da doença, os quais buscam curar o paciente e evitar a transmissão do bacilo para a comunidade. Contudo, a não-adesão ao regime terapêutico, quer seja por abandono devido a longa duração ou efeitos adversos dos antibióticos, são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da resistência na tuberculose (DUCATI et al., 2006; HUF; KRITSKI, 2012).

Os principais fatores atribuídos ao desafio global da tuberculose incluem a incidência de novos casos de tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) e o crescimento populacional de co-infectados por HIV. A TB-MDR é causada por cepa

de *M. tuberculosis* resistente a pelo menos duas drogas essenciais no regime terapêutico, isoniazida e rifampicina. Segundo a OMS a TB é a principal causa de óbitos por resistência antimicrobiana (WHO, 2020).

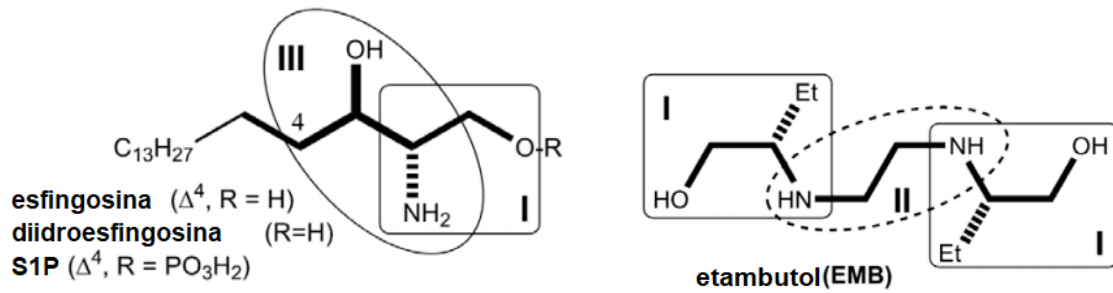
Além disso, a questão da resistência aos medicamentos tem aumentado de forma constante, exigindo tratamento mais longos, mais tóxicos, oneroso, e que requer um monitoramento clínico adicional - não sendo acessíveis ou disponíveis para a maioria dos pacientes (SCHITO; HANNA; ZUMLA, 2017). Portanto, é urgente a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de novas drogas eficazes, com capacidade de encurtar o tratamento e com baixa toxicidade, para ser utilizada como parte da estratégia no controle dessa epidemia (WHO, 2014). Embora vários compostos estejam atualmente em fases avançadas de ensaio clínico, durante os últimos 50 anos nenhum fármaco foi introduzido no mercado para tratamento da tuberculose (SHEHZAD et al., 2013).

A esfingosina (SPH) é um aminodiol natural, insaturado, que integra esfingolipídios, ceramidas e outros metabólitos lipídicos. É biossintetizada através do seu precursor saturado, a diidroesfingosina (DSPH). A esfingosina-1-fosfato (S1P), forma ativada da SPH, tem sido reconhecida como um mediador fisiológico multifuncional e envolvida em alguns processos biológicos, tais como: a mobilização do Ca^{2+} , o crescimento celular, diferenciação, motilidade e organização do citoesqueleto (LYNCH; MACDONALD, 2008). De modo interessante, a SPH, S1P, ceramidas e outros componentes lipídicos exercem papel fundamental nos endossomos contendo o Mtb, que por sua vez induz a ativação lisossomal em células infectadas pelo bacilo (ANES et al., 2003). Estes achados deram suporte à pesquisa com esfingonálogos como droga efetiva contra o reservatório humano de MTB, a forma de tuberculose latente crônica (DEL OLMO et al., 2009a).

Estruturalmente, a SPH e DSPH apresentam um fragmento aminoetanol duplicado (hidroxietilamina - Figura 1, destaque I e III) que também está presente em duplicata, embora separado por uma “ponte de etileno”, na estrutura de um antimicobacteriano de primeira linha, o etambutol (EMB). A ponte central de etilenodiamina presente na estrutura do EMB (Figura 1, destaque II) é, também, necessária para a atividade antimicobacteriana. Portanto, em estudo prévio foram sintetizados derivados do tipo aminoetanol e etilenodiamina, saturados e simplificados, revelando uma potente atividade anti-micobacteriana *in vitro* frente a cepas sensíveis e multirresistentes (DEL OLMO et al., 2009a). No presente estudo,

novos compostos relacionados à DSPH e ao EMB foram avaliados quanto à presença de atividade antimicrobacteriana em cepas de *Mtb* sensível e multidroga resistente, bem como caracterizar suas propriedades farmacológicas *in vitro* e *in silico*.

Figura 1 - Base estrutural da pesquisa com correlação de fragmentos entre as moléculas de esfingolípídeos e etambutol.



Fonte: Del Olmo et al. (2009)

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DAS MICOBACTÉRIAS

As micobactérias pertencem à família Mycobacteriaceae e ordem dos Actinomycetales. O gênero compreende espécies saprofitas, bem como patógenos obrigatórios e facultativos. São aeróbios ou anaeróbios facultativos e de acordo com as condições de crescimento o bacilo pode apresentar variações no tamanho e na forma: cocobacilos a bastões longos. Com relação às dimensões são relatadas como sendo de 1 a 10 μm de comprimento e 0,2 a 0,6 μm de largura (AKBAR VELAYATI; FARNIA, 2012; WILSON; PILLAY; STURM, 1999). A depender das condições não favoráveis de crescimento, o bacilo pode apresentar variações morfológicas peculiares: bacilo curto em cultura envelhecida, filamentosos após serem fagocitados por macrófago, ovóide em condições de poucos nutrientes e produção de “botões” e ramificações em cepas multidroga resistentes (FARNIA et al., 2010; SHLEEVA et al., 2011).

A primeira identificação de uma micobactéria (*Mycobacterium leprae*, originalmente *Bacillus leprae*) foi realizada por Hansen em 1874, ao estudar a origem das manifestações clínicas da lepra (GRZYBOWSKI et al., 2013). Oito anos após, Robert Koch (1882) detectou o bacilo causador da tuberculose – *Mycobacterium tuberculosis*, em amostra corada de tecido infectado e que posteriormente cultivou o organismo em meio espesso com soro (KOCH, 1891). O bacilo da tuberculose apresenta uma taxa de divisão celular lenta, ocorre a cada 20 a 24 horas, em contrapartida ao que é observado na maioria das bactérias que se dividem em menos de 01 hora (DANGERFIELD et al., 2010).

Subsequentemente à descoberta destes bacilos, foram descritas várias espécies micobacterianas, o que levou ao agrupamento das mesmas na classificação de Runyon. O agrupamento teve como base a taxa de crescimento e propriedades pigmentativas (RUNYON, 1959). As espécies de crescimento rápido produzem numerosas colônias extremamente visíveis no período de 3 a 5 dias, enquanto as de crescimento lento necessitam de, no mínimo, duas semanas para formar colônias visíveis em meio sólido (SMITH, 2003).

As micobactérias de crescimento lento compreendem (*i*) espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) - causadoras da tuberculose humana e animal

(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. canettii*) e (ii) espécies atípicas - causadoras de infecções oportunistas, identificadas como Micobactérias não Tuberculosas (MNT). Exemplos de MNT de importância clínica: *M. avium* e *M. kansasii*. Já as micobactérias de crescimento rápido compreendem apenas espécies de MNT e destas as que apresentam relevância médica são: *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis* (BROWN-ELLIOTT; PHILLEY, 2017; LEE et al., 2010).

Algumas espécies produzem pigmentos carotenoides, normalmente as espécies de crescimento rápido, que levam à formação de colônias de cor amarela brilhante ou alaranjadas. Quando ocorre tal produção por estímulo de luz, estas são nomeadas de fotocromogênicas; e quando a pigmentação ocorre mesmo na ausência do estímulo de luz, são ditas espécies escotocromogênicas (SHINNICK; GOOD, 1994).

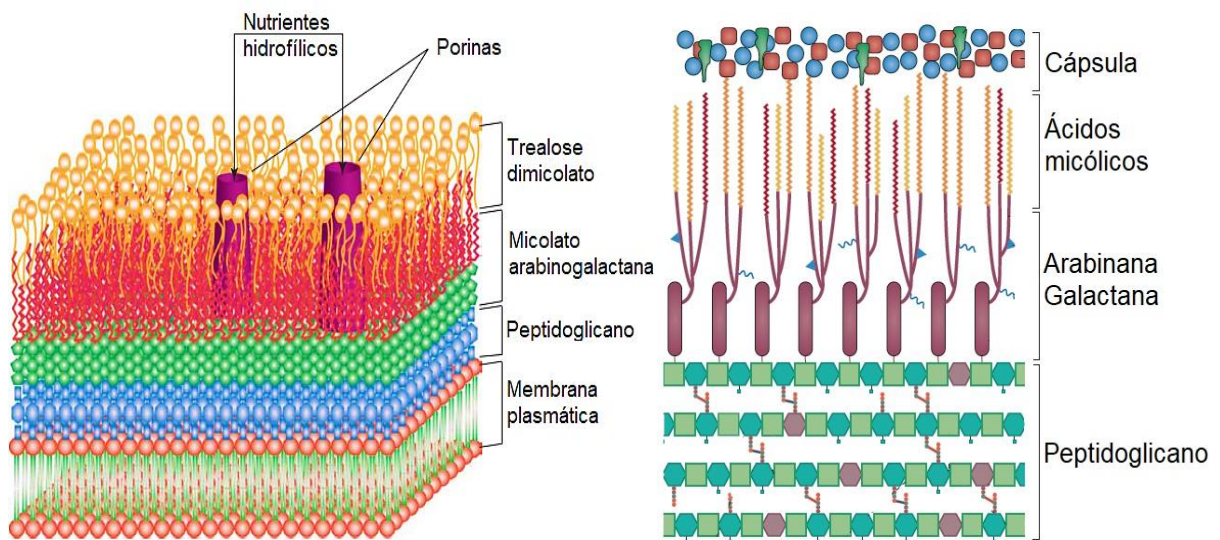
2.2 O ENVELOPE MICOBACTERIANO

As micobactérias são consideradas como um organismo Gram positivo, pois a maioria dos genes apresentam alta similaridade aos genes contidos em outros organismos Gram positivos (HETT; RUBIN, 2008). Contudo, são coradas fracamente ou negativamente pelo método de Gram, e por isso, o método recomendado de identificação de micobactérias através de coloração baseia-se na resistência do bacilo à descolorização por álcool acidificado subsequente ao uso da fucsina básica – método de Ziehl-Neelsen (GRZEGORZEWICZ; JACKSON, 2013; SHINNICK; GOOD, 1994). O bacilo apresenta, também, alta resistência a desinfetantes suaves e consegue sobreviver fora do corpo por semanas (DANGERFIELD et al., 2010).

A resistência dos bacilos a lesões químicas, desidratação e a certos antibióticos está estritamente relacionada à baixa permeabilidade do envelope micobacteriano (figura 2) a pequenas moléculas hidrofílicas (LIU, 1999). O conteúdo lipídico do envelope micobacteriano corresponde a 40% da massa celular seca; comparado a menos de 5% em bactérias Gram positivas e 10% em bactérias Gram negativas. A permeabilidade às moléculas hidrofílicas desta parede é cerca de 10 a 100 vezes menor do que a *P. aeruginosa*, outro bacilo notavelmente impermeável (JARLIER; NIKAIDO, 1990; TRIAS; BENZ, 1994). Tal impermeabilidade do envelope justifica a presença de proteínas formadoras de poro (porinas, figura 2) bem como torna

difícil uma resposta efetiva do hospedeiro ao combater este patógeno (DAFFÉ, 2015).

Figura 2 - Ilustrações do envelope celular micobacteriano. Na esquerda, demonstrando o aspecto tridimensional do envelope e suas camadas; à direita, detalhe da conformação e interação entre as macromoléculas constituintes da parede celular do *Mycobacterium* spp.



Fonte: Ilustrações adaptadas de Nguyen e Thompson (2006) e Kieser e Rubin (2014), respectivamente.

O que faz as micobactérias serem bem-sucedidas a agressões externas é a complexidade do envelope celular, tornando-o um verdadeiro escudo. Tal envelope é constituído por uma típica membrana plasmática envolvida por uma estrutura intrincada de macromoléculas distintas e ligadas covalentemente (figura 2). O cerne da parede celular (figura 2, direita) é composto por camadas de peptidoglicano (PG) e arabinogalactana (AG), na qual os ácidos micólicos estão ligados e que por sua vez é cercado por uma camada mais externa - ligada de modo não covalente, chamada de cápsula. Há ainda o espaço periplasmático, situado entre a membrana plasmática e a camada de peptidoglicano.

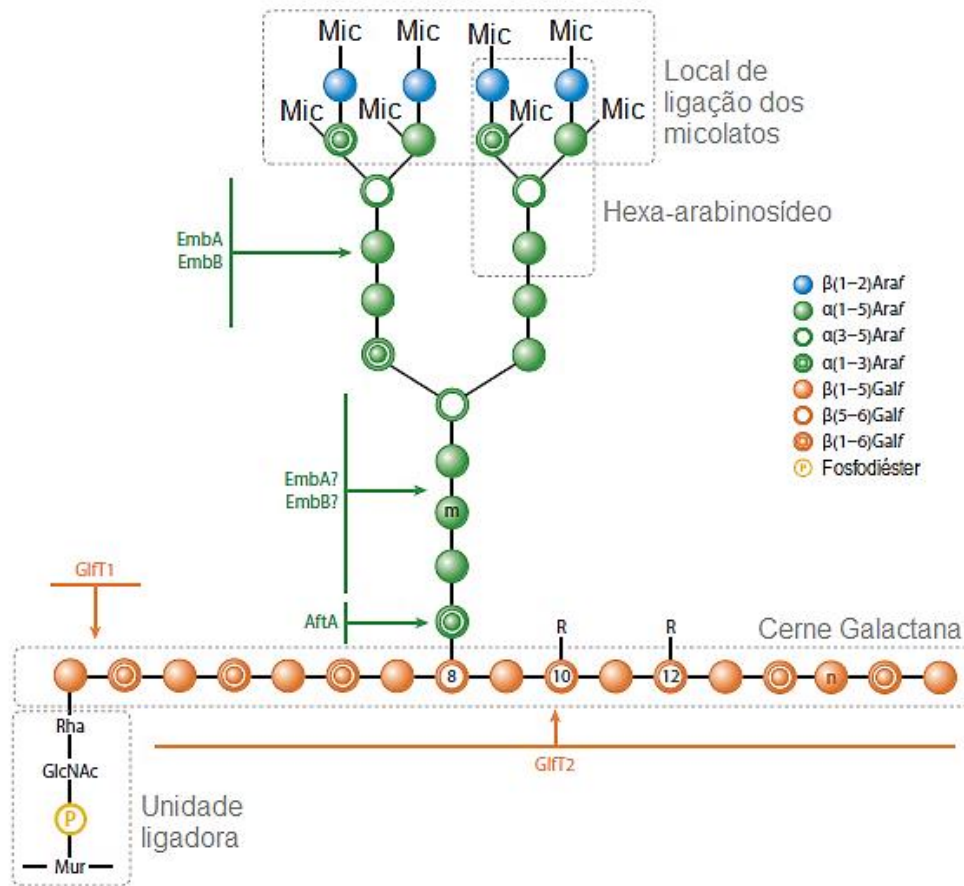
O peptidoglicano é um glicopolímero constituído de unidades alternadas de N-acetil glucosamina (NAG) e ácido N-acetil murâmico (NAM), os quais são interligados por cadeias laterais de pequenos peptídeos. Os precursores do peptidoglicano, lipid II, são gerados no citoplasma e transportado até o periplasma através da proteína transmembranar MviN. Conseqüentemente, hidrolases são requeridas para abrir a rede de peptidoglicano para inserção de novos precursores. As proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), PonA1 e PonA2, participam ao incorporar novas subunidades à

estrutura pré-formada (KIESER; RUBIN, 2014). A rede de PG apresenta alto grau de ligações cruzadas nas espécies de *Mycobacterium* spp. (70-80% comparado a 30-50% em *E. coli*) (ANGALA et al., 2014).

O polímero de PG das micobactérias apresenta modificação que não é observada na maioria das bactérias, como a glicosilação dos resíduos de ácido murâmico. Foi observado por Raymond et al. (2005) que o *M. smegmatis* detinha uma enzima responsável por converter o ácido N-acetil murâmico para ácido N-glicosil murâmico. Observaram, ainda, que na ausência dessa enzima a cepa exibia um aumento na susceptibilidade a antibióticos β -lactâmicos e à lisozima. Desse modo, a camada de PG confere rigidez e manutenção da forma bacteriana, bem como promove uma resistência intrínseca a alguns agentes antimicrobianos e a efeitos provocados por mudança na pressão osmótica (ANGALA et al., 2014).

O heteropolissacarídeo arabinogalactana (AG) é composto por arabinana e galactana na forma de furanose e é covalentemente ligado à camada de PG através de unidades ligadoras de fosforil-N-acetilglucosaminosil-ramnosil (figura 3). A parte linear da AG, a galactana, é composta por aproximadamente 30 unidades alternadas de galactofuranose (6-D-Galf β 1-5-D-Galf β) e são sintetizados pelas galactofuranosil transferases (GlfT1 e GlfT2). Essas duas enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular utilizam como substrato a UDP-Galf e catalisam a transferência dos dois primeiros resíduos de galactofuranose (Galf), bem como a adição dos resíduos Galf remanescentes. Tal componente linear atua como uma estrutura de ancoragem de resíduos de ácido murâmico à camada de PG. A porção ramificada (figura 3) de arabinana contém 3 cadeias e cada uma destas são formadas por aproximadamente 30 resíduos de arabinofuranosil (Araf) (BHAMIDI et al., 2008; JANKUTE et al., 2012).

Figura 3 - Estrutura da arabinogalactana micobacteriana e as enzimas envolvidas na sua biossíntese.



Fonte: Modificado de Jankute et al. (2015).

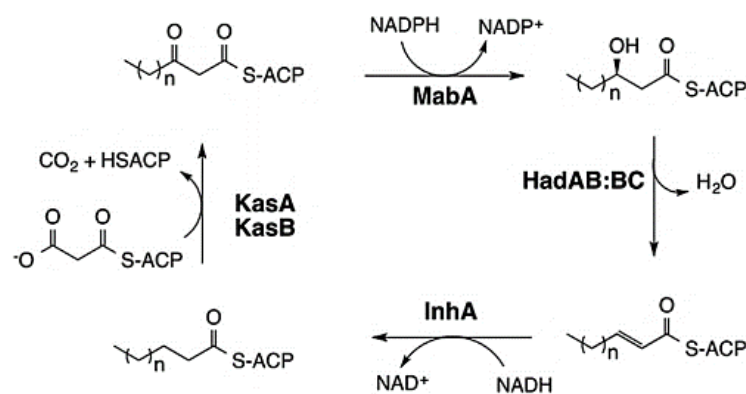
O único açúcar doador de resíduo *Araf*, necessário para a biossíntese do motivo arabinana, é o decaprenilmonofosforil-D-arabinose (DPA) (ALDERWICK et al., 2011). Uma das enzimas do locus *emb*, *AftA* – arabinofuranotransferase A, catalisa a adição do primeiro resíduo *Araf* na cadeia de galactana nas posições 8, 10 e 12. Posteriormente há a extensão da cadeia por outras arabinofuranotransferases (JANKUTE et al., 2012). Em um estudo utilizando silenciamento do gene codificador da enzima *AftA* em *M. smegmatis*, foi demonstrada ser essencial à viabilidade celular a transferência do primeiro resíduo de *Araf* à cadeia de galactana. E com isso, foi elucidada a importância da enzima *AftA* como um alvo potencial para desenvolver uma nova classe de inibidores, juntamente com o etambutol, para interromper a montagem da parede celular de micobactérias (SHI et al., 2008).

Polimerização adicional de arabinana é catalisada por *EmbA* e *EmbB*, enzimas com atividade α -1,5 transferase e que atuam como heterodímero. Essas proteínas

também apresentam papel na formação do terminal crucial da AG - o motivo hexa-arabinofuranosil, o qual é o template para a reação de micolação (ESCUYER et al., 2001). Os genes *emb* são conservados em diferentes espécies micobacterianas e no *M. tuberculosis* eles estão contidos em um operon com três genes, *embC*, *embA* e *embB*. É proposto que a proteína EmbB seja o alvo do etambutol, uma droga conhecida por inibir a síntese da porção arabinana da parede celular micobacteriana (ESCUYER et al., 2001).

Os micolatos estabelecem uma ligação covalente com o domínio ramificado, arabinana, através do motivo hexa-arabinofuranosil (figura 3). Os ácidos micólicos apresentam massa molecular elevada e formam um denso revestimento ceroso, característico das micobactérias, e que contribui principalmente na impermeabilidade da parede celular e na virulência do organismo (BHATT et al., 2007; HETT; RUBIN, 2008). Estes são constituídos de ácidos graxos curtos α -alquila e β -hidroxi de cadeia longa, ligados através de esterificação à PG e AG ou presente como parte de um glicolípido intercalado, como o dimicolato de trealose - fator corda (BHATT et al., 2007; BRENNAN; NIKAIDO, 1995).

Figura 4 - Representação esquemática do complexo enzimático Ácido Graxo Sintase II (FAS-II) na biossíntese de ácidos micólicos.



Fonte: Chollet et al. (2015)

Ácidos micólicos são formados a partir de dois ácidos graxos, ramificação α de cadeia curta saturada, com 20 a 26 carbonos, ligada a uma ramificação de meromicolato contendo 60 a 90 carbonos. Essas ramificações são geradas pelos complexos multi-enzimáticos de ácido graxo sintase I e II (FAS-I e FAS-II) e o substrato ligado à proteína carreadora de acila (ACP) que passa por repetidos ciclos

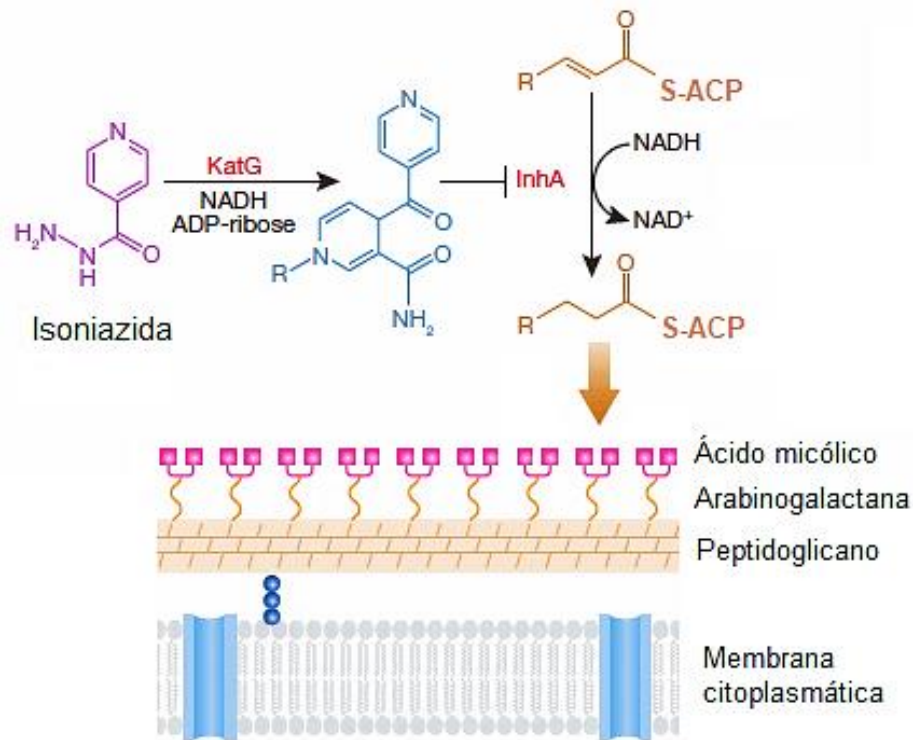
de redução (BHATT et al., 2007). Inicialmente são biossintetizadas cadeias curtas de ácidos graxos saturados pela FAS-I que podem formar a porção α -alquila (24 carbonos) ou são transferidos para FAS-II onde são alongadas para formar a cadeia-mero contendo 56 carbonos (JANKUTE et al., 2012).

Uma reação de condensação é catalisada pela β -cetoacil-ACP sintase III (FabH) utilizando malonil AcpM e palmitol-CoA, resultando em β -cetoacil-AcpM. A enzima MabA (β -cetoacil-ACP redutase) (figura 4) reduz esse intermediário para produzir a β -hidroxiacil-AcpM que é posteriormente desidratada para produzir a *trans*-2-enoil-AcpM pela enzima HadAB/BC (β -hidroxiacil-ACP desidratase). A InhA (enoil-ACP redutase) então reduz este segundo intermediário para dar origem um acil-AcpM estendido por dois carbonos. KasA/B (β -cetoacil ACP sintase) continua o ciclo FAS-II com condensação adicional via MabA, HadAB/BC e InhA. Esse processo cíclico continua até que a cadeia acila atinja 42 a 62 carbonos, formando o meromicolato de cadeia longa saturada. A PKS 13 catalisa a ligação do substrato meromicolil-AMP a cadeia curta α -alquila (de 22 a 24 carbonos) para produzir α -alquila- β -ceto ácido micólico que é subsequentemente reduzido (JANKUTE et al., 2015; TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005).

Alguns fármacos antimicobacterianos são conhecidos por exercer sua atividade bloqueando a biossíntese dos ácidos micólicos. A isoniazida (figura 5) é um dos medicamentos eficientes utilizados na quimioterapia contra a TB. Após sua ativação pela enzima KatG, ocorre a inibição da enoil-ACP redutase (InhA), uma enzima dependente de NADH e pertencente ao complexo FAS-II. Assim, impede que ocorra a catalisação da última etapa redutiva no alongamento de ácido graxo, impossibilitando a formação de moléculas essenciais na via de biossíntese dos micolatos.

Finalmente, uma estrutura semelhante a uma cápsula, ligeiramente anexada na parte mais externa do *Mtb*, consiste principalmente de polissacarídeos e proteínas com pequenas quantidades de lipídios. De modo importante, a natureza e as quantidades de membrana externa e materiais capsulares variam com os isolados de *Mtb* e essa diversidade em termos de composição da superfície provavelmente afetará significativamente a maneira como o *Mtb* interage com o hospedeiro (ANGALA et al., 2014).

Figura 5 - Inibição da biossíntese de ácido micólico pela isoniazida.



Fonte: Ilustração adaptada de Wright (2012).

2.3 TRATAMENTO

A primeira droga com atividade contra o *M. tuberculosis* (*Mtb*) foi descoberta 78 anos atrás. Em 1943 Albert Schats e seus colaboradores purificaram um antibiótico a partir do *Streptomyces griseus*, a estreptomicina (SM), um produto natural produzido por bactéria isolada do solo (SCHATZ; BUGLE; WAKSMAN, 1944). Dois anos depois, o Conselho de Pesquisa Médica (MRC) no Reino Unido foi o pioneiro em iniciar um estudo controlado, randomizado, para avaliação clínica do uso da estreptomicina contra a tuberculose. Os resultados demonstraram eficácia nos primeiros 3 meses de tratamento, entretanto dados dos 5 anos seguintes não mostraram benefícios uma vez que a taxa de mortalidade (58% para estreptomicina vs 76% nos controles) foi efetivamente a mesma e quase todos os pacientes desenvolveram resistência à estreptomicina (FOX; SUTHERLAND; DANIELS, 1954; MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1948).

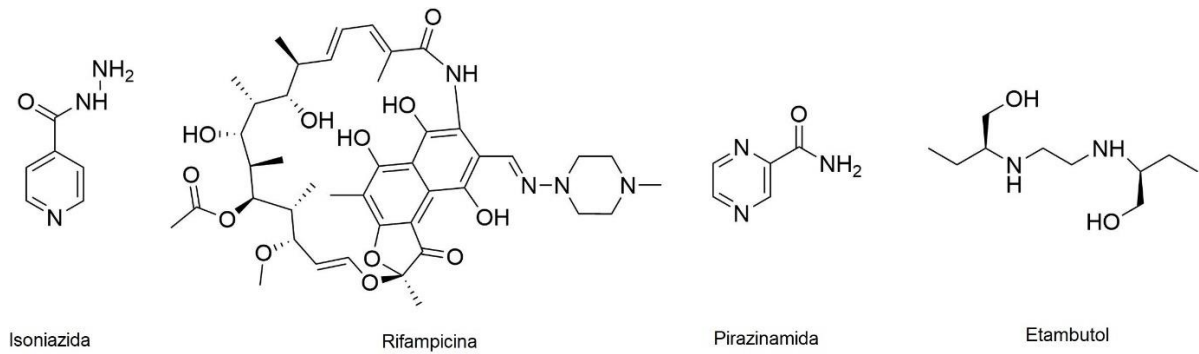
No final de 1948 o ácido para-aminossalicílico (PAS) – sintetizado em 1943 – foi introduzido em um novo ensaio clínico randomizado que foi conduzido com o

objetivo de comparar a eficácia de duas drogas combinadas ou sendo utilizadas como monoterapia. Demonstrou-se que o uso diário de PAS com SM apresentou resultados melhores do que o grupo tratado com uma droga e que esta combinação preveniu o desenvolvimento de cepas resistentes à estreptomicina (DANIELS; HILL, 1952). Estes foram os primeiros dados que demonstraram a importância da terapia combinada para o tratamento da tuberculose.

Em 1951, uma terceira droga, hidrazida do ácido isonicotínico (figura 6) ou isoniazida (INH), que foi adicionada à combinação anterior, resultou em curas previsíveis de 90 a 95% dos pacientes, mas que ainda precisava ser administrado por 18 – 24 meses (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1955).

A substituição do PAS por etambutol (EMB) (figura 6) na década de 1960 levou à redução da duração do tratamento para 18 meses (DOSTER et al., 1973). Nos anos 70, a introdução da rifampicina (RMP) no esquema terapêutico, um produto semissintético derivado da *Streptomyces mediterranei*, foi o maior avanço na terapia contra a TB. O tratamento padrão que durava 18 meses foi modificado para 9 meses (HONG KONG CHEST SERVICE/BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1979). Finalmente, a pirazinamida (PZA) foi adicionada ao regime de tratamento na década de 1980. A nova introdução permitiu a redução do tratamento em 3 meses, e através da combinação de PZA, INH e RIF (figura 6), a taxa de cura subiu para 95% (SINGAPORE TUBERCULOSIS SERVICE/BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1986).

Figura 6 - Estrutura química dos agentes de primeira linha no tratamento da tuberculose.



Fonte: Chollet et al. (2015).

2.3.1 Regimes de tratamento antituberculose

Os principais objetivos no tratamento para a tuberculose são: a cura do paciente, prevenir a propagação da doença para outros e, evitar o desenvolvimento e transmissão da tuberculose resistente. Este tratamento é o mais desafiador porque implica precisão e diagnóstico precoce, triagem de resistência a fármacos e a administração de regimes de tratamento efetivo durante pelo menos 6 meses através de terapia diretamente observada (TDO) e monitoramento do paciente (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013). Sem tratamento as taxas de mortalidade para esta doença são altas. Foi observado que dentre os casos de TB pulmonar com esfregaço positivo/HIV negativo, entre 53% a 86% vieram a óbito dentro de um período de 10 anos; e dentre os casos com cultura positiva (mas esfregaço negativo) 20% morreram dentro de 10 anos (TIEMERSMA et al., 2011).

Atualmente, existem alguns agentes para o tratamento de tuberculose sensível, e alguns medicamentos designados para o tratamento do tipo droga resistente. Essas drogas são divididas em primeira e segunda linha (Tabela 1). As drogas de segunda linha são utilizadas em casos especiais, como resistência ou intolerância às drogas.

Para eliminar todos os bacilos é necessário saber que eles estão localizados em três diferentes compartimentos: aqueles nas paredes das cavidades pulmonares e replicando mais “rapidamente”, aqueles nas lesões sólidas ácidas e replicados a uma taxa mais baixa e aqueles que estão latentes ou quase dormentes em macrófagos ou lesões sólidas (MITCHISON, 2000). A cura efetiva é alcançada quando há o uso adequado da combinação das drogas que podem eliminar os bacilos nesses três compartimentos diferentes (GRANGE; ZUMLA, 2008). Para assegurar tal

realização, o regime terapêutico foi dividido em duas fases: (i) a fase inicial (ou intensiva) para reduzir rapidamente a carga micobacteriana e melhorar os sintomas; (ii) a fase de continuação (ou manutenção) para eliminar bacilos residuais e evitar recidiva (DUARTE et al., 2010).

Tabela 1 - Principais antimicobacterianos e doses recomendadas.

| Droga | Dose diária e variação (mg/Kg peso corporal) |
|--|---|
| Primeira linha | |
| Isoniazida | 5 (4 - 6) |
| Rifampicina | 10 (8 - 12) |
| Pirazinamida | 25 (20 - 30) |
| Etambutol | 15 (15 - 20) |
| Segunda linha | |
| Injetável: | |
| Estreptomina, canamicina, amicacina, capreomicina. | 15 (12 - 18) |
| Fluoroquinolonas: | |
| Ofloxacina, levofloxacina. | 750 - 1000 mg/dia |
| Bacteriostáticos oral: | |
| Etionamida, protionamida | 500 mg/dia (peso corporal < 50 Kg); 750 mg/dia (> 50 Kg) ou 1000 mg/dia (> 70 Kg) |
| Cicloserina | Mesma dose da etionamida |
| Ácido para-aminossalicílico | 8 g/dia (peso corporal < 70 Kg); 8 - 12 g/dia (>70 kg) |

Fonte: WHO, 2016.

2.3.1.1 Tuberculose sensível:

As diretrizes para o tratamento da tuberculose feitas pela Organização Mundial de Saúde estabelecem uma clara distinção entre dois grupos: novos casos (aqueles que nunca receberam tratamento anti-TB ou que receberam por um período menor que um mês) e casos de retratamento (aqueles que receberam tratamento por mais de 30 dias).

O regime padrão para o tratamento de novos pacientes com TB (independentemente do *status* de HIV) que são presumidos ou conhecidos como causados por cepa sensível às drogas é realizado em 6 meses. Na fase intensiva, 4 medicamentos são utilizados por um período de 2 meses: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Nos casos de meningite tuberculosa o etambutol deve ser substituído por estreptomicina. Na fase de manutenção, o tratamento permanece apenas com isoniazida e rifampicina por mais 4 meses. A administração das doses deve ocorrer diariamente ou três vezes por semana, mas a administração diária é a mais recomendada, uma vez que as taxas de resistência adquirida foram maiores entre os pacientes que receberam as doses três vezes por semana durante a terapia (WHO, 2010, 2017).

O teste de susceptibilidade às drogas (TSD), rápido ou convencional, é altamente recomendado pela OMS antes do início do tratamento, especialmente nos casos de retratamento. Enquanto se aguarda os resultados do teste, um regime empírico pode ser iniciado para os casos de retratamento em áreas com risco médio a baixo de TB-MDR. Tal regime consiste em 2 meses de isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina, seguido de 1 mês de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol; e 5 meses de isoniazida, rifampicina e etambutol.

2.3.1.2 Tuberculose multidroga resistente

A tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) é definida como resistente, no mínimo, a isoniazida e rifampicina. O tratamento é longo e requer o uso de drogas de segunda linha que são mais caras, mais tóxicas e menos eficazes. Os regimes individualizados guiados por TSD devem ser preferidos, no entanto, na ausência de tais dados específicos, a informação representativa da população de pacientes do local é utilizada para desenvolver e projetar um regime empírico (FALZON et al., 2011).

O tratamento da TB-MDR deve incluir pelo menos quatro medicamentos potencialmente ativos (tabela 1): um medicamento injetável (amicacina ou canamicina), uma fluoroquinolona de nova geração (moxifloxacina ou levofloxacina), dois ou mais bacteriostáticos orais, além de qualquer medicamento de primeira linha para o qual o isolado é susceptível. A duração do regime deve ser de pelo menos 20 meses: 6 a 8 meses, ou mais, de drogas injetáveis na fase intensiva, seguida de uma

fase de continuação de 12 a 18 meses. O esfregaço e a cultura devem ser realizados mensalmente, e a partir da data da primeira cultura negativa o tratamento deve continuar por 18 meses (WHO, 2014).

Durante o tratamento, é importante monitorar o paciente devido a reações adversas aos fármacos, o que pode reduzir a complacência do paciente, aumentar a probabilidade de falha terapêutica e desenvolver maior resistência aos medicamentos de segunda linha.

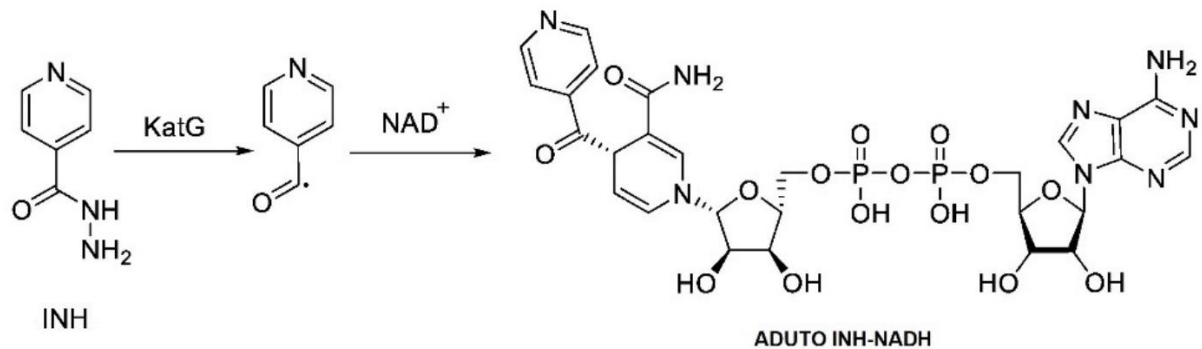
2.3.2 Drogas essenciais no tratamento: como elas funcionam?

2.3.2.1 Isoniazida (INH)

Quimicamente conhecido como hidrazida do ácido 4-piridinocarboxílico (figura 6) ou hidrazida do ácido isonicotínico, a INH é um pró-fármaco (não ativo) que entra nos bacilos por difusão passiva e requer ativação para causar efeito. A forma tóxica é ativada dentro do bacilo pela enzima catalase-peroxidase (KatG), codificada pelo gene *katG* (ZHANG et al., 1992). Esta enzima protege o *Mtb* de lesões prejudiciais causadas pelo peróxido de hidrogênio gerado durante o metabolismo oxidativo (MUSSER, 1995). A droga ativada (figura 7), na forma de ácido nicotínico, forma um adutor covalentemente ligado com NAD⁺ e NADP⁺ bacilar e inibe principalmente a enzima InhA (enoil-ACP redutase, codificada pelo gene *inhA*). Essa enzima está envolvida no alongamento de ácidos graxos na síntese de ácido micólico e pela função prejudicada há o comprometimento da formação da parede celular (RAWAT; WHITTY; TONGE, 2003).

INH é o agente com a maior Atividade Bactericida Precoce (EBA), ou seja, é capaz de reduzir rapidamente a carga de bacilos metabolicamente ativos em cavidades tuberculosas. Com o uso da INH há uma redução de 90% no número de bacilos viáveis em amostra de escarro dentro de 2 dias. Na prática, faz com que o escarro do paciente deixe de ser infeccioso, reduz os sintomas e o risco de emergir cepas resistentes (DIACON; DONALD, 2014; DONALD et al., 2004). No entanto, a isoniazida apresenta ação diminuída em bacilos com atividade metabólica diminuída, como no estágio latente ou na fase *lag* de crescimento (ZHANG et al., 1992).

Figura 7 - Estrutura química e bioativação da INH com formação do aduto responsável pela inibição da InhA.



Fonte: Chollet et al. (2015)

Alguns indivíduos apresentam uma condição de infecção latente por tuberculose, ou seja, o bacilo permanece viável por longo período no hospedeiro, contudo o paciente não desenvolve sintomas e não ocorre o risco de transmissão da micobactéria. Nesses casos, a INH pode ser utilizada como monoterapia de 9 a 6 meses para prevenir o desenvolvimento da tuberculose ativa (TANG; JOHNSTON, 2017).

2.3.2.2 Rifampicina (RMP)

A 3-((4-metil-1-piperazinil) iminometil) rifamicina SV (figura 6), rifampicina ou rifampin, é um dos fármacos anti-TB mais eficazes e, juntamente com a isoniazida, constitui a base do regime de tratamento multidrogas para a tuberculose. É ativo contra o bacilo metabolicamente ativo e contra o bacilo latente persistente (baixa atividade metabólica) e sua característica principal é a capacidade de esterilizar lesões de TB dentro de 6-9 meses (DICKINSON; MITCHISON, 1981).

A rifampicina entra no bacilo e exerce sua atividade no citoplasma inibindo o processo de transcrição. Especificamente, se liga à subunidade β da RNA polimerase (DNA dependente) para formar um complexo estável fármaco-enzima e, portanto, bloqueia fisicamente a síntese de RNA - alongamento da cadeia de mRNA (TELENTI et al., 1993). Após a administração oral, há uma boa penetração no tecido pulmonar, cavidades tuberculosas e rins. Baixas concentrações são alcançadas em lesões ósseas piogênicas, empiema pleural e líquido cefalorraquidiano (RIVA; SILVESTRI, 1972).

A rifampicina induz a expressão de várias proteínas (por exemplo enzimas microssomais, enzimas de fase II, transportadores de fármacos) que influenciam o metabolismo de outras drogas. Conseqüentemente, há uma redução na concentração de alguns medicamentos e pode resultar em uma menor eficácia do fármaco concomitante com aumento da toxicidade, caso as concentrações de um metabólito tóxico forem aumentadas. RMP também pode potencializar a hepatotoxicidade da isoniazida, pirazinamida e outras drogas (DONALD; MCILLERON, 2009).

2.3.2.3 Pirazinamida (PZA)

A pirazina-2-carboxamida (figura 6) ou pirazinamida é um análogo da nicotinamida que desempenha um papel importante na redução do período de tratamento de 9-12 meses para 6 meses (FOX; ELLARD; MITCHISON, 1999). Tem a característica única de eliminar uma população de bacilos dormentes e persistentes em meio ácido, como em sítios inflamatórios granulomatosos e dentro do fagossoma de macrófagos infectados, na qual outras drogas não conseguem exercer atividade. Então, a característica principal deste medicamento é ter uma atividade de esterilização que, em combinação com outras drogas, permite a redução do tempo de tratamento (ZHANG et al., 2014).

De maneira similar à isoniazida, a pirazinamida também é um pró-fármaco que deve ser ativado para exercer seu efeito. A droga entra por difusão passiva e a conversão para a sua forma ativa, o ácido pirazinoico (POA), é catalisada pela pirazinamidase/nicotinamidase codificada pelo gene *pncA* do Mtb. Uma bomba de efluxo exporta o POA produzido intracelularmente e, sob as condições ácidas extracelulares, o POA é protonado. Em seguida, permeia através da membrana e se acumula dentro do bacilo devido a uma bomba de efluxo ineficaz. Este acúmulo reduz o pH intracelular, afeta o transporte de membrana (causado por uma desordem no potencial de membrana) e resulta na inibição de várias enzimas e morte celular (ZHANG et al., 2003).

Outro mecanismo de ação proposto para a PZA foi recentemente elucidado. A forma ativa, POA, inibe um mecanismo de defesa em bacilos que ocorre apenas sob estresse e baixo metabolismo: a trans-tradução (ZHANG et al., 2014). A trans-tradução é um processo que remove proteínas tóxicas, produtos formados sob condição de estresse, adicionando uma *tag* tmRNA que é uma sequência de

reconhecimento de protease e que, em seguida, é enviada para degradação por proteases. O POA liga e inibe a proteína ribossomal S1 (RpsA), que está envolvida no processo de trans-tradução por se ligar especificamente ao tmRNA (SHI et al., 2011). Estes mecanismos até agora elucidados podem explicar a habilidade única da pirazinamida de esterelizar bacilos persistentes.

2.3.2.4 Etambutol (EMB)

Etambutol ou 2,2'-(1,2-etanodiildimino)*bis*-1-butanol (figura 6) é um agente bacteriostático contra bacilos metabolicamente ativos. É usado com outras drogas do regime terapêutico para evitar o surgimento de resistência ou para limitar a extensão de uma possível resistência existente. O EMB substituiu o PAS e a estreptomicina por ser muito mais tolerado e mais ativo; além de ser ativo contra cepas resistentes à isoniazida e à estreptomicina (AHMAD; MAKAYA; GROSSET, 2011; WILKINSON et al., 1961).

As evidências sugerem que esta ação antimicobacteriana é devido à inibição de arabinofuranosil transferases, enzimas diretamente envolvidas na biossíntese da parede celular. Esta enzima está envolvida primeiro na polimerização de arabinose em arabinano e, finalmente, em arabinogalactano, um componente de parede celular micobacteriana (MIKUSOVÁ et al., 1995). Observou-se que após a administração de EMB existe um acúmulo de D-arabinofuranosil-P-decaprenol, um intermediário na biossíntese de arabinogalactano (TAKAYAMA; KILBURN, 1989; WOLUCKA et al., 1994). Sugerindo, assim, uma ação primária da droga é a inibição de enzimas arabinofuranosil transferases.

A maior preocupação durante o período de administração de etambutol é a sua capacidade de produzir neurite retrobulbar. A baixa acuidade visual, visão turva, a constrição do campo visual, escotoma (“ponto cego”) central ou periférico, anormalidades na percepção de cor e a cegueira para a cor verde-vermelho, são alguns dos efeitos colaterais e a gravidade dependerá da dose e da duração do regime (FRAUNFELDER; SADUN; WOOD, 2006).

2.4 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE DROGAS ANTI-TUBERCULOSE

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos compostos envolve uma combinação de genômica, bioinformática e ensaios fenotípicos. A pesquisa de novos compostos para tuberculose é um processo lento, oneroso e envolve duas abordagens distintas: seleção baseada em um único alvo ou seleção baseada em triagem fenotípica (KOUL et al., 2011).

Por meio do completo sequenciamento do genoma do *Mtb* foi possível o conhecimento de sequência de genes e funções de várias proteínas, levando a um número de potenciais alvos terapêuticos (CHETTY et al., 2017). A partir de produtos genômicos foi possível gerar estruturas tridimensionais, que fornecem informações a cerca das funções das proteínas promovendo um passo importante na descoberta de medicamentos (COOPER, 2013). Tais estruturas são catalogadas em banco de dados, como no Banco de Dados de Proteínas (PDB, www.rcsb.org).

O conhecimento estrutural 3D proporciona, assim, a identificação de sítio de ligação e estudo das interações para que ocorra a ligação entre ligante-receptor. Esses estudos são feitos por triagem *in silico*, com utilização de docking molecular. No entanto, a utilização dessa metodologia vem demonstrando pouco sucesso devido a complexidade da célula micobacteriana (KOUL et al., 2011; PAVAN et al., 2011).

Ensaio fenotípicos oferecem uma maior chance de descoberta de inibidores *hits*. Esta estratégia foi responsável por identificar os primeiros fármacos, bem como as recentes classes de compostos sintéticos em diferentes estágios de ensaios clínicos: bedaquilina, delamanida, SQ109, TBA-7371 e pretomanida (quadro 1) (CHETTY et al., 2017; COOPER, 2013). Entretanto, a conversão dessas séries químicas em candidatos clínicos é dificultada pela falta de conhecimento para identificar alvos específicos. Portanto, devido à tendência de gerar resultados falso-positivo em abordagens moleculares *in silico*, bem como às lacunas geradas em ensaios fenotípicos, há uma necessidade de pareamento de ambas as técnicas para o campo de descoberta e otimização de novos compostos para tuberculose (GRZELAK et al., 2019).

Quadro 1 - Pipeline de novos fármacos em ensaios clínicos para tratamento da tuberculose sensível e multidroga resistente.

| Classe | Fármaco(s) | Alvo | Fase | Observações |
|-----------------------|--------------------------|---|------|---|
| Diarilquinolina | Bedaquilina | ATP sintase | 3 | Aprovação condicional de comercialização Estudos de segurança de fase 1b concluídos nos Estados Unidos |
| Imidazopiridina amida | Q203 | Visa à subunidade do citocromo b do complexo do citocromo bc1, essencial para a cadeia respiratória de elétrons, também esgota o ATP intracelular | 1 | Estudo de fase 1 de escalonamento de dose em andamento (NCT02858973) |
| | | Atividade semelhante à da bedaquilina | | Estudo de atividade bactericida precoce que se espera que seja iniciado antes do final de 2017 |
| Nitroimidazol | Delamanid | Inibir a síntese da parede celular e a respiração celular | 3 | Aprovação condicional de comercialização |
| | Pretomanida | | 3 | Aguardando aprovação reguladora Redução significativa das contagens de unidades formadoras de colônias em estudo sobre atividade bactericida precoce |
| Oxazolidinona | Sutezolida | Síntese proteica no ribossomo 23s | 2a | Fase 1a concluída apenas recentemente (NCT03199313), em razão de problemas de licenciamento |
| | Delpazolida (LCB01-0371) | | 2 | Estudo de fase 2 de segurança e atividade bactericida precoce do fármaco que se espera que seja concluído no final de 2017 Pode ser sinérgico com bedaquilina |
| 1,2-etilenodiamina | SQ109 | Inibir a síntese da parede celular (MmpL3) | 2-3 | Dois braços contendo SQ109 de um ensaio PanACEA que testava rifampicina em altas doses foram interrompidos precocemente pois os limites pré-especificados de eficácia não foram atingidos |
| | PBTZ169 | | 2 | Sinergias com bedaquilina e clofazimina |
| Benzotiazinona | OPC-167832 | Inibidores DprE1 (inibir a síntese da parede celular) | 1 | Codesenvolvido como fármaco complementar ao delamanid considerando-se um esquema para pantuberculose |
| | TBA-7371 | | 1 | Iniciado ensaio de fase 1a (NCT03199339) |
| Riminofenazina | TBI-166 | Membrana externa, cadeia respiratória bacteriana e transportadores de íons | 1 | Análogo melhorado da clofazimina Início da fase 1 na China em outubro de 2017 |
| Oxaborol | GSK 070, GSK 3036656 | Síntese proteica (leucil-RNAt sintetase) | 1 | Fase 1 concluída (NCT03075410) |

Fonte: Silva et al. (2018)

2.5 ESFINGOANÁLOGOS COMO AGENTE TERAPÊUTICO

A diidroesfingosina (esfinganina, ou (2S,3R)-2-aminoctadecano-1,3-diol) é o componente básico do anabolismo de esfingolípídios e ceramidas em mamíferos e

consiste de uma molécula com comprimento de cadeia de 18 átomos de carbono (PRUETT et al., 2008).

Essa categoria de amino álcoois alifáticos de cadeia longa engloba centenas de compostos designados como “bases esfingóides” que possuem variações estruturais em: comprimento da cadeia, número, posição e estereoquímica de ligações dupla, grupos hidroxilas e outras funcionalidades. Estes compostos são encontrados em mamíferos, fungos, plantas, insetos, parasitas e organismos aquáticos e até então, eram considerados apenas como componentes estruturais das membranas celulares eucarióticas (MCQUISTON; HALLER; POETA, 2006).

A esfinganina é uma das principais bases esfingóides encontradas em diversos organismos e é o intermediário na biossíntese *de novo* da esfingosina através da dessaturação de diidroceramidas para produzir ceramidas e consecutivamente, a esfingosina. Por sua vez, a esfingosina, bem como seus derivados, detém funções biológicas cruciais na sinalização celular: regulação da proliferação celular, resposta oxidativa, interrupção do ciclo celular, diferenciação, apoptose, inflamação e resposta imune (MCQUISTON; HALLER; POETA, 2006; ZHENG et al., 2006).

A forma ativada da esfingosina, esfingosina 1-fostato (S1P), é um dos lipídios sinalizadores mais estudados atualmente (LYNCH; MACDONALD, 2008). Uma das observações é que a S1P é uma molécula proeminente no trânsito linfocitário e que utilizar medicamento que imite essa sinalização poderia modular o sistema imunológico e assim, obter um efeito terapêutico considerável (MANDALA et al., 2002). Em um estudo utilizando a SPH e S1P foi observado que os macrófagos infectados pelo Mtb e tratados com esses lipídeos conseguiram diminuir significativamente o crescimento intracelular do Mtb. De modo geral, houve ativação da nucleação de actina e maturação do fagossoma nos macrófagos infectados, resultando em significativa eliminação do microrganismo (ANES et al., 2003). Ainda, em estudo *in vivo* foi demonstrado por Garg e colaboradores (2004) que a administração de S1P em camundongos infectados por Mtb, houve uma redução no crescimento micobacteriano bem como redução de danos no tecido pulmonar.

Por estas moléculas fazerem parte, juntamente com o colesterol, de microdomínios na estrutura de membrana celular (*raft* lipídicos) não é surpreendente que muito microorganismos intracelulares utilizem esfingolipídios durante o curso da infecção (SCHMITZ; GRANDL, 2008). O HIV, por exemplo, não consegue biossintetizar esfingolipídeos, contudo utiliza estas moléculas do hospedeiro para

adentrar e montar sua estrutura (MCQUISTON; HALLER; POETA, 2006). Os *rafts* de membrana atuam ao mediar a internalização de bactérias, vírus e parasitas nas células do hospedeiro e desse modo iniciam uma cascata de reações para promover apoptose e liberação de sinalizadores. Ultimamente há um aumento no interesse nestas moléculas, bem como enzimas metabolizadoras de esfingolipídios como mediadoras da patogenicidade microbiana e, por conseguinte, potencial alvo no desenvolvimento de novas terapias (MCQUISTON; HALLER; POETA, 2006).

As bases esfingóides apresentam uma considerável diversidade estrutural e a descoberta de moléculas semelhante a estas (alguns que ocorrem naturalmente e outros análogos sintetizados) são promissores compostos “leads” no desenvolvimento de novos medicamentos enquanto outros causam doenças (PRUETT et al., 2008). Aplidiaesfingosina, composto base esfingóide isolado de uma espécie de peixe marinho, *Aplidium*, foi notável por apresentar atividade antimicrobiana e antimicobacteriana, antiviral e antitumoral (PRUETT et al., 2008). Já o FTY720 (ou fingolimode), análogo da esfingosina, é utilizado clinicamente no tratamento da esclerose múltipla e tem sido testado com sucesso na prevenção de rejeição de transplante por suprimir o controle do sistema imune (BRINKMANN et al., 2010). Compostos análogos a esfinganina apresentaram alta potência frente a cepas sensível e multidroga resistente de *Mtb*, *in vitro* e em camundongos infectados (DEL OLMO et al., 2009b; OLMO et al., 2016). Ademais, estes análogos apresentaram atividade anti-inflamatória e analgésica em modelos *in vivo* (DE CAMPOS BUZZI et al., 2010).

Contudo, há ocorrência de toxinas de fungos que mimetizam esfingolipídios (referenciadas como micotoxinas análogas a esfinganina) que representam risco a saúde humana e animal. As fumonisinas, por exemplo, induzem apoptose de células saudáveis e eventos neoplásicos em mamíferos (WANG et al., 1996).

3 JUSTIFICATIVA

A tuberculose (TB) continua sendo considerada como uma emergência de saúde pública global. No último relatório da OMS foi registrado uma taxa de 10 milhões de novos casos da doença no mundo. Destes, 66,8 mil novos casos foram relacionados ao Brasil. Pernambuco é o terceiro estado do país com a maior taxa de incidência. Acrescenta-se, ainda, o impacto da crescente taxa de multidroga resistência (MDR) e do longo tratamento com a utilização de drogas onerosas, mais tóxicas ao paciente e com baixa taxa de cura.

Dentro desse contexto, propomos a pesquisa de novos compostos que apresentem menos efeitos adversos, maior potência e que reduzam o tempo de tratamento e assim, o aumento da qualidade de vida do paciente durante o regime terapêutico. Como substância protótipo desta pesquisa destacamos a esfingosina – componente celular natural, que estruturalmente contém porções semelhantes ao fármaco de primeira linha, o etambutol. Deste modo, o presente projeto visa contribuir no desenvolvimento e avaliação biológica de novas moléculas contra o *M. tuberculosis* e entender seu mecanismo de ação. Ademais, há possibilidade de consolidar parceria internacional, com a transferência científica e tecnológica para a indústria farmacêutica nacional/local com o objetivo de diminuir a dependência na importação de fármacos e insumos para produção de medicamentos.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a atividade farmacológica de compostos análogos a diidroesfingosina e etambutol como possíveis protótipos de fármaco antimicobacteriano.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o potencial antimicobacteriano *in vitro* dos novos compostos frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e multidroga resistente;
- Avaliar a atividade citotóxica das substâncias em linhagens celulares de mamíferos;
- Avaliar o espectro de atividade antibacteriana de compostos selecionados;
- Determinar a interação farmacológica *in vitro* entre o compostos selecionados e os antimicrobianos utilizados no esquema terapêutico usual;
- Determinar a cinética de morte das micobactérias em presença dos compostos selecionados;
- Avaliar a atividade de composto(s) em modelo de infecção micobacteriana *in vitro*;
- Avaliar *in silico* a afinidade dos compostos pela enzima MmpL3 e descrever suas interações intermoleculares;
- Avaliar o efeito do composto selecionado na ultraestrutura do *M. tuberculosis*;

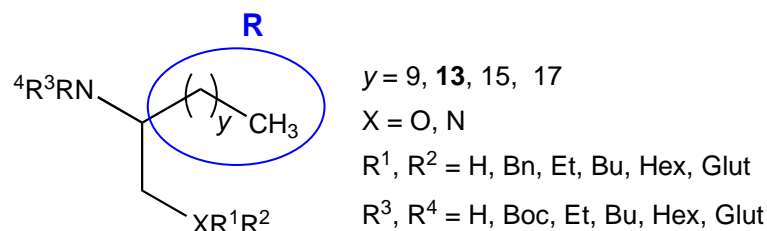
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

A síntese, comprovação estrutural e caracterização dos compostos avaliados neste estudo foram realizadas no Laboratórios do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca - USAL (Espanha). As condições de reação e os processos químicos foram previamente estabelecidos e publicados na literatura científica (DE CAMPOS BUZZI et al., 2010; DEL OLMO et al., 2009a; LUCAS et al., 2000).

Inicialmente foram avaliados cinco compostos com estrutura de base 2-aminoalcano-1-ol e quatro compostos do tipo alcano-1,2-diamina, como listados na tabela 2. A partir destes, outros compostos foram sintetizados com objetivo de otimizar o tamanho da cadeia (R) em ambas as séries (figura 8), encurtando ou alongando-a e fazendo modificações de grupos funcionais. Estes compostos estão relacionados nas tabelas 3 e 4.

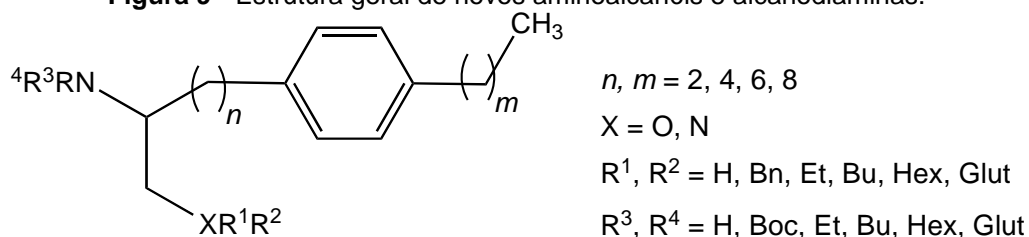
Figura 8 - Estrutura geral de aminoalcanóis e alcanodiaminas.



Legenda: R: tamanho da cadeia lateral; y: quantidade de carbono; X: radicais; R¹⁻⁴: substituintes.

Fonte: o autor.

Na terceira fase, foi sintetizada uma nova série de compostos, mantendo as funcionalidades mais ativas anti-TB, incorporando um fragmento benzênico na cadeia e cuja estrutura está representada na figura 9, com variações em *m* e *n*. Tais compostos, com esqueleto de base 1-aminoalcano-2-ol, estão identificados na tabela 5. Para este estudo foram sintetizados um total de 47 compostos (tabelas 2, 3, 4 e 5).

Figura 9 - Estrutura geral de novos aminoalcanóis e alcanodiaminas.

Fonte: o autor.

Tabela 2 - Compostos do tipo aminoalcanol (OA) e diaminas (AA) previamente sintetizados e estudados.

| Amostra | Fórmula | Peso Molecular |
|---------|------------|----------------|
| c-1 | C16H35NO | 257 |
| c-2 | C23H41NO | 347 |
| o-7 | C25H45NO | 375 |
| c-3 | C27H49NO | 403 |
| o-13 | C20H43NO | 313 |
| c-4 | C16H36N2 | 256 |
| c-5 | C21H44N2O2 | 356 |
| a-3 | C23H48N2O2 | 384 |
| c-6 | C20H44N2 | 312 |

Fonte: o autor.

Tabela 3 - Série de compostos do tipo 2-aminoalcan-1-ol otimizados e sintetizados.

| Amostra | Fórmula | Peso Molecular |
|---------|----------|----------------|
| d-6 | C12H27NO | 201 |
| d-7 | C19H39NO | 285 |
| d-8 | C14H31NO | 229 |
| o-1 | C18H39NO | 285 |
| d-9 | C20H43NO | 313 |
| o-2 | C16H35NO | 257 |
| o-3 | C20H43NO | 313 |
| o-4 | C22H47NO | 341 |
| o-5 | C22H47NO | 341 |
| o-6 | C26H55NO | 397 |
| o-11 | C21H54NO | 369 |
| d-1 | C25H45NO | 375 |
| d-2 | C27H49NO | 403 |
| o-8 | C29H53NO | 431 |
| o-9 | C29H53NO | 431 |

Continuação da **Tabela 3** - Série de compostos do tipo 2-aminoalcan-1-ol otimizados e sintetizados.

| Amostra | Fórmula | Peso Molecular |
|----------------|----------------|-----------------------|
| o-10 | C31H57NO | 459 |
| d-3 | C23H41NO | 347 |
| d-4 | C29H53NO | 431 |
| d-5 | C31H57NO | 459 |
| o-12 | C26H47NO4 | 437 |

Fonte: o autor.

Tabela 4 - Série de compostos do tipo alcano-1,2-diamina otimizados e sintetizados.

| Amostra | Fórmula | Peso Molecular |
|----------------|----------------|-----------------------|
| d-10 | C13H28N2O2 | 244 |
| d-11 | C15H32N2O2 | 272 |
| d-12 | C19H40N2O2 | 328 |
| a-1 | C23H48N2O2 | 384 |
| a-2 | C25H52N2O2 | 414 |
| d-13 | C17H36N2O2 | 300 |
| d-14 | C19H40N2O2 | 328 |
| d-15 | C27H56N2O2 | 440 |
| a-4 | C25H52N2O2 | 412 |
| a-5 | C27H56N2O2 | 440 |
| a-6 | C25H50N2O2 | 442 |
| a-7 | C21H42N4O2 | 382 |

Fonte: o autor.

Tabela 5 - Série de compostos do tipo 1-aminoalcan-2-ol otimizados e sintetizados

| Amostra | Fórmula | Peso Molecular |
|----------------|----------------|-----------------------|
| o-14 | C16H27NO | 249 |
| o-16 | C18H31NO | 277 |
| o-18 | C20H35NO | 305 |
| o-15 | C21H35NO3 | 349 |
| o-17 | C23H39NO3 | 377 |
| o-19 | C25H43NO3 | 405 |

Fonte: o autor.

5.2 TESTES *IN VITRO*

5.2.1 Microrganismos e meio de cultura bacteriano

O *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) foi utilizado neste estudo como cepa de referência da American Type Culture Collection, classificada como sensível a todas as drogas de primeira linha (isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida). Neste estudo foi utilizado um isolado clínico (*Mtb* 1576) com perfil de multidroga resistente (isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina e levofloxacina) fornecido pelo Laboratório Central de Saúde Pública - Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN – PE). Utilizamos também micobactéria não tuberculosa, de crescimento rápido, *M. smegmatis* (ATCC 607) como modelo paralelo de estudo micobacteriano.

As micobactérias foram cultivadas em caldo Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), com 0,2% de glicerol e 0,05% de Tween 80. O tempo de incubação variou de 3 dias para *M. smegmatis* (Msm) e 7 a 10 dias para *Mtb*, ambas a 37°C. Para contagem de colônias foi utilizado o meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de OADC e 0,5% de glicerol, com tempo de incubação de 3 dias para Msm e 21 a 28 dias para *Mtb*.

As bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) foram selecionadas como representativas dos grupos Gram positiva e Gram negativa, respectivamente. Essas foram cultivadas em caldo Mueller Hinton a 37°C por 18 a 20h.

Todas as cepas de referência ATCC foram obtidos a partir da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ.

5.2.2 Antimicrobianos de referência e drogas testes

Os seguintes antibióticos foram utilizados como controle positivo de atividade: isoniazida, rifampicina, etambutol, levofloxacina, amicacina (Sigma Aldrich), oxacilina (Eurofarma) e ceftazidima (BioChimico). Esses fármacos foram solubilizados em solventes apropriados (água destilada estéril, dimetilsulfóxido (DMSO) ou NaOH a 0,1N) e padronizados a uma solução estoque de 10 mg/mL.

A série de compostos sintetizados foram solubilizadas em DMSO (Sigma) para obtenção de uma solução estoque numa concentração a 20 mM. Após solubilização, os fármacos e compostos foram aliquotados e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.3 Determinação de atividade antimicobacteriana *in vitro*

A atividade antimicobacteriana dos compostos sintetizados foi determinada através da Concentração Inibitória Mínima através do método colorimétrico de microdiluição em placas de 96 poços, descrito por Palomino et al. (2002).

Com o propósito de evitar a evaporação do sistema de meio de cultura e compostos diluídos, devido ao longo período de incubação, 200 μL de água destilada foi adicionado nos poços do perímetro externo da microplaca. Em seguida, foi depositado nos poços restantes 100 μL de caldo 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,2% de glicerol. Diluições seriadas de 1:2 dos compostos foram realizadas diretamente na microplaca, com concentração variando entre 64 μM a 2 μM . O etambutol foi utilizado como controle positivo de atividade antimicobacteriana, com concentração variando entre 16 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Poços de controle positivo de crescimento do inóculo e controle de esterilidade do meio de cultura foram incluídos em todas as placas.

A cultura de *Mtb* H37Rv e MDR 1576, em fase logarítmica de crescimento, foi transferida para um tubo cônico contendo pérolas de vidro e PBS com 0,05% de Tween 80 e agitada em vórtex por dois minutos. Em seguida fora colocada em repouso vertical por quinze minutos, para permitir a deposição de grumos e redução de aerossol. O sobrenadante foi aspirado para outro tubo e padronizado com a escala nº 01 de Mc Farland. Posteriormente, foi realizado uma diluição de 1:20 (v/v) e 100 μL dessa suspensão ($\sim 1,5 \times 10^7$ UFC/mL) adicionada nos poços apropriados. As placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas a 37°C em atmosfera normal por 7 dias.

Após o período de incubação, 30 μL de uma solução estéril de resazurina (Sigma Aldrich) a 0,01% foi adicionada em todos os poços e reincubada *overnight*, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. A CIM foi definida como a menor concentração da droga que preveniu a mudança de coloração de azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido). Os “pontos-de-corte” (*cutoff*) para definir susceptibilidade/resistência das cepas frente aos antimicobacterianos padrão foram:

0.25, 0.5 e 5 µg/ml para INH, RMP e EMB, respectivamente (SANCHOTENE et al., 2008).

5.2.4 Determinação da citotoxicidade (CC₅₀)

Para a realização do ensaio de citotoxicidade, o teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi realizado em placa de 96 poços de acordo com Mosmann (1983) e modificações. Foram utilizadas as linhagens J774A.1 (ATCC TIB-67), VERO (ATCC CCL-81) e HepG2 (ATCC HB8065), correspondentes a macrófago murino, epitélio renal de primata e hepatócito humano – respectivamente. Foram cultivadas em meio DMEM ou RPMI 1640 enriquecidos com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (estreptomicina – 100 µg/mL e penicilina 100 U/mL). O cultivo foi mantido a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂ até atingir a confluência celular.

As células foram recuperadas, ressuspendidas em meio apropriado e uma alíquota foi quantificada com auxílio do azul de Tripán em câmara de Neubauer. Em seguida foi realizado o ajuste para que no semeio houvesse 1 x 10⁵ células por poço e incubadas por 24h nas mesmas condições iniciais de cultivo para permitir a adesão celular. Os compostos foram submetidos a diluição seriada todos os pontos (400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µM) em meio apropriado à linhagem celular e estas soluções foram transferidas para a placa contendo as células e reincubadas por mais 48h. Poços controle foram utilizados apenas com células e meio de cultura, bem como o controle do DMSO em meio (1% a 0,01%). O etambutol também foi adicionado como controle negativo de citotoxicidade, por apresentar similaridade estrutural com os compostos avaliados.

Após 48h de exposição foram adicionados 25 µL da solução de MTT em PBS (5mg/mL). As placas foram reincubadas por três horas, protegida de luz direta, nas mesmas condições de ambiente e temperatura. Após esse período o meio foi aspirado, e 100 µL de DMSO foram adicionados para dissolução dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT em células viáveis. A absorbância de cada poço foi medida através do filtro de 540nm em leitor de placas.

O valor de CC₅₀ foi definido como a maior concentração do composto em que 50% das células permaneceram viáveis e estimado por análise de regressão

logarítmica dos valores encontrados, através do software GraphPad Prism. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram considerados como compostos promissores, e selecionados para as etapas seguintes de avaliação, aqueles que apresentaram o índice de seletividade (SI) ≥ 10 , conforme a equação 1, bem como uma CIM $\leq 10 \mu\text{M}$. O cálculo de seletividade consiste na razão entre o valor de CC_{50} obtidos para cada linhagem celular e a CIM dos compostos frente ao *Mtb* H37Rv. O valor obtido permite inferir na seletividade do composto em inibir o microorganismo sem maiores danos à célula do hospedeiro (ORME, 2011; KATSUNO et al. 2015).

$$SI = \frac{CC50}{CIM} \quad (1)$$

5.2.5 Triagem de atividade antibacteriana

Compostos selecionados foram testados quanto ao espectro de ação frente a micobactéria não tuberculosa, e bactérias Gram positiva e Gram negativa. Para tal, foi utilizado o ensaio de microdiluição em caldo e a suas atividades expressas através da CIM. Para a micobactéria de crescimento rápido, *M. smegmatis*, foi utilizado o caldo Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,2% de glicerol em todas as etapas do ensaio. E para a determinação da CIM em *S. aureus* e *K. pneumoniae* foi utilizado o caldo Mueller-Hinton cátion ajustado.

Os compostos foram diluídos em meio de cultura apropriado ao microorganismo a ser avaliado e foi realizada uma diluição seriada de fator 2 em 100 μL de caldo. A concentração das substâncias variou de 512 a 4 μM . Em seguida foi adicionado 100 μL de inóculo bacteriano. Para os três microrganismos foi padronizado uma suspensão em caldo apropriado de tal maneira a atingir 5×10^4 UFC por poço (CLSI, 2018a; TANEJA; TYAGI, 2007). Como controle positivo de atividade antibacteriana foram utilizados a amicacina, oxacilina e ceftazidima contra *Msm*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por um período de 18 h para as bactérias Gram positiva e negativa e por 24 horas para *Msm*. Em seguida, 30 μL de uma solução de resazurina a 0,01% fora adicionada aos poços e incubados por 2 h para *S. aureus* e *K. pneumoniae*, e por 24 h para *Msm*.

A concentração que preveniu a redução da resazurina (azul) em resorufina (rosa) foi determinada como a CIM desses compostos. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

5.2.6 Determinação da interação farmacológica *in vitro*

Foi utilizado o método clássico *checkerboard* de microdiluição bidimensional para avaliar a interação entre fármacos antimicrobianos e os compostos sintéticos selecionados (LORIAN, 2005). Isoniazida, rifampicina e etambutol foram utilizados como antibióticos de primeira linha; amicacina e levofloxacina como antibióticos de segunda linha. No eixo x da placa de 96 poços foi distribuído, através de diluição seriada, o antimicrobiano de referência e no eixo y a diluição seriada da substância sintética selecionada. A faixa de concentração dos antibióticos e compostos foram selecionadas por meio dos resultados obtidos através da CIM, iniciando por 8 x CIM e diluições sub-inibidoras. Em seguida, 100 µL da suspensão das cepas de *Mtb* sensível (H37Rv) e multidroga resistente (1576) foram ajustadas em 1×10^7 UFC/mL e adicionadas em todos os poços. Foram reservados poços de controle de crescimento positivo do inóculo (meio 7H9 suplementado e bactéria) e controle de esterilidade do meio (apenas caldo 7H9 suplementado). As placas foram cobertas por suas tampas, seladas com plástico filme e incubadas a 37 °C, em atmosfera normal, por 7 dias. Após o período de incubação, 30 µL da solução de resazurina a 0,02% foi adicionada em todos os poços da microplaca. As placas foram novamente incubadas, a 37 °C por 48h. A mudança da coloração de azul para rosa (resazurina reduzida pela presença de viabilidade celular) indicou o crescimento micobacteriano.

Os resultados foram interpretados pelo índice de concentração inibitória fracionado (FICI) (conforme a fórmula 2), onde FIC A é o quociente entre a concentração inibitória mínima do antibiótico “A” na presença do composto “B” e a concentração inibitória mínima do antibiótico “A” isolado. Valores de FICI ≤ 0.50 foram considerados como compostos sinérgicos; > 0.50 a 4.0, indiferentes; e > 4 , antagonicos. Resultados sinérgicos foram representados graficamente através de isobogramas (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2013).

$$\sum FICI = FIC_A + FIC_B \quad (2)$$

Onde:

$$FIC_A = \frac{CIM_A \text{ na presença do B}}{CIM_A}$$

$$FIC_B = \frac{CIM_B \text{ na presença do A}}{CIM_B}$$

5.2.7 Cinética de morte micobacteriana

Um inóculo padronizado com uma densidade de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL de *M. smegmatis* na fase logarítmica de crescimento foi ressuspensão em caldo 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,2% de glicerol. Alíquotas dessa suspensão foram distribuídas em tubos cônicos de 50 mL contendo caldo 7H9-suplementado e nas seguintes condições: controle (sem inibidor); 1 x CIM de rifampicina; 1 x CIM do composto c-2, o-12 e d-15; e combinações entre antibiótico e composto selecionado – ambos a 1 x CIM. Todos os tubos foram colocados em incubadora a 37 °C e agitação de 120 rpm (LORIAN, 2005). O isolado clínico multidroga resistente de *M. tuberculosis* foi utilizada nas mesmas condições descritas anteriormente e exposta ao composto o-12 isolado, ao antibiótico rifampicina isolado, e à combinação entre esses – em todos foram utilizadas uma concentração final de 1 x CIM.

Para quantificar o número de bactérias viáveis ao longo do tempo, amostras de 100 µL foram retiradas de todos os tubos, a partir do tempo 0h, e realizado diluições seriadas decimais em PBS com 0,05% de Tween 80. As alíquotas foram coletadas no tempo 0, 6, 24, 48 e 72h para *M. smegmatis*, e 0, 2, 5 e 12 dias para *M. tuberculosis*. Essas amostras foram plaqueadas em ágar Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de OADC e 0,5% de glicerol e colocadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 3 a 5 dias (Msm) ou 21 a 28 dias (Mtb) (GARIMA et al., 2015). Após esse período foi realizado a contagem das unidades formadoras de colônia e resultado plotado em gráfico em escala logarítmica de base 10 versus tempo. O experimento foi realizado em triplicata.

5.2.8 Modelo *in vitro* de infecção

A infecção de células J774 por *M. smegmatis* foi realizado de acordo com Santos et al. (2019) seguido de modificações. Antes da infecção a micobactéria foi cultivado por 2 dias a 37°C em caldo 7H9 e no dia do experimento foi realizado uma padronização do inóculo através da escala nº 01 de Mc Farland. A suspensão foi passada dez vezes em agulha de insulina 27 G para obter o máximo de uma suspensão unicelular bacteriana. Posteriormente, essa suspensão foi diluída em meio DMEM para obter uma quantidade de inóculo de aproximadamente 5×10^6 UFC/mL.

O macrófago J774 foi semeado em placa de 96 poços com a finalidade de se obter 1×10^5 células por poço e incubado por 24h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Após esse período o sobrenadante, contendo células não aderentes, foi aspirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida as células foram infectadas com a suspensão bacilar em meio DMEM suplementado, e utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1. Após 1 hora de infecção dos macrófagos os poços foram lavados e foi adicionado em todos os poços uma solução de amicacina (50 µg/mL) diluída em meio DMEM, com a finalidade de matar todas as bactérias não fagocitadas. Posterior às 2 horas de ação do antibiótico, o sobrenadante foi retirado e todos os poços foram lavados três vezes com DMEM.

O composto avaliado foi selecionado com base no índice de seletividade (IS) > 10, sendo considerado mais seletivo contra o bacilo (UC-CACHÓN et al., 2014). Os poços, em triplicata, referente ao tempo zero pós infecção receberam uma solução de SDS a 0,025% para promover a lise das células e recuperação dos bacilos internalizados. Os poços controle receberam meio DMEM suplementado e contendo 0,2% de DMSO (solvente dos compostos, sem tratamento) e os poços de tratamento receberam meio DMEM suplementado e contendo: rifampicina (19,5 µM); 2x CIM da rifampicina (39 µM); o-12 (16 µM); 2x CIM do o-12 (32 µM), assim como a associação de rifampicina com o o-12 (16 µg/mL+ 16 µM). As placas voltaram para a estufa a 37°C e 5% CO₂. Além do tempo zero pós-infecção, os poços foram avaliados em 6h e em 24h, seguido de lise dos macrófagos para quantificação da carga bacteriana. Uma alíquota de 100 µL de cada lisado foi diluída em PBS e plaqueada em ágar 7H10 suplementado. As placas de ágar foram levadas à estufa a 37 °C e incubadas por 3 dias, seguido de contagem das colônias.

Os dados obtidos no modelo de infecção *in vitro* foram avaliados previamente quanto a abordagem paramétrica ou não paramétrica. Desta forma, as variáveis envolvidas no estudo foram testadas à posteriori quanto a homogeneidade dos dados utilizando o teste de Bartlett. Em seguida utilizou-se o teste Anova com post hoc Tukey ao se observar homogeneidade nos dados e avaliando assim as diferenças de médias. Valor de p estabelecido $p < 0,05$ como nível de significância.

5.3 DOCKING MOLECULAR

As estruturas tridimensionais dos compostos, incluindo seus enantiômeros R e S, foram desenhadas usando o programa SPARTAN 08' (Wavefunction, Inc.) e a otimização de cada estrutura foi realizada aplicando o método RM1 (ROCHA et al., 2006), disponível como parte integrante do programa SPARTAN 08', utilizando-se padrões internos de critérios de convergência.

As análises de docking molecular foram realizadas na enzima transportadora de ácido micólico MmpL3 do *Mycobacterium tuberculosis*, cuja estrutura tridimensional foi obtida através do processo de modelagem por homologia utilizando a ferramenta SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018). O modelo selecionado foi construído utilizando a estrutura tridimensional do *M. smegmatis* (PDB: 6AJG) possuindo como ligante co-cristalizado o composto SQ109 em seu sítio ativo. Aparentemente, esta enzima é bastante conservada entre diferentes espécies uma vez que, em termos de identidade de sequência, ou seja, a quantidade de aminoácidos desta enzima é idêntica em ambas as espécies, o modelo obtido possui 71,43% de identidade. O sítio de ligação foi definido como todos os átomos dentro de 6.0 Å a partir do ligante SQ109.

O programa GOLD 5.7 (Cambridge Crystallographic Data Centre, UK) foi aplicado para os cálculos de docking molecular, usando-se a função de pontuação padrão (ChemPLP). Com o intuito de levar em consideração os graus de liberdade da enzima e, assim, simular melhor o efeito de ajuste induzido, os seguintes resíduos de aminoácido foram tratados como flexíveis, usando-se a biblioteca de conformações: ASP251, TYR252, PHE255, THR284, SER288, ILE292, SER295, ASP640, TYR641 e PHE644. As figuras foram geradas utilizando o programa Pymol (SCHRÖDINGER, LLC, 2015).

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para avaliar a ultraestrutura do *M. tuberculosis* após tratamento com os compostos. Uma suspensão padronizada em 10^7 UFC/mL foi submetida às seguintes condições: exposição à concentração inibitória do composto o-12 (8 μ M), concentração inibitória do etambutol (1 μ g/mL, controle positivo) e sem fármaco (controle negativo) (BLECK et al., 2010). Estas culturas foram incubadas a 37°C por 96 h. Após esse período as culturas foram centrifugadas, lavadas 3 vezes em PBS e fixadas com 4% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído (v/v) em 0,1M de tampão cacodilato (pH 7,2) por 1 h em temperatura ambiente, e posteriormente por 12 h na geladeira (JAMES; WILLIAMS; MARSH, 2000).

Após a fixação, as amostras foram lavadas (3X) em PBS (pH 7,2) e pós-fixadas por 1 hora no escuro em uma solução de 1% de tetróxido de ósmio com 0,8% de ferricianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio em 0,1M de tampão cacodilato. Depois desse período, as amostras foram novamente lavadas (3X) em PBS (pH 7,2) e, em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 15.000g para que se obtivesse um sedimento compacto. Este sedimento foi transferido para uma placa de Petri contendo 70% de acetona e cortado em pequenos fragmentos de cerca de 1 mm de espessura. A desidratação das amostras foi feita em concentrações crescentes de acetona: 70%, 90% e 100% (2X) (20 minutos em cada concentração). As células foram infiltradas por cerca de 96 horas em resina epoxy Poly Bed 812 (Epon) (Polysciences, Inc) e polimerizadas em estufa a 60°C por 72 horas. Após a polimerização, os blocos de Epon foram fatiados com faca de diamante (Diatome) no ultramicrótomo (Leica – Ultracut UCT). Os cortes ultrafinos de cor prateada (que medem aproximadamente 70nm) foram coletados em grades de cobre, de 300 mesh e, posteriormente, contrastados no escuro com 5% de acetato de uranila por 30 minutos e 5% de citrato de chumbo por 3 minutos. Finalmente, as grades foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit.

6 RESULTADOS

6.1 ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E CITOTOXICIDADE

Dos 47 compostos sintetizados para este estudo, 24 demonstraram boa atividade contra cepas de *M. tuberculosis* de referência (H37Rv) e um isolado clínico com fenótipo de multi-resistência a isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina e à fluoroquinolonas (*Mtb* pré-XDR - 1576).

Inicialmente foram sintetizados e avaliados 6 compostos, do tipo aminoalcanol e diaminas. Os compostos c-1, c-2, c-3, c-4, c-5 e c-6 exerceram boa a baixa atividade antimicobacteriana contra as cepas de *M. tuberculosis* (tabela 6 e 7). As concentrações inibitórias variaram em 1.52 a > 64 μ M para a cepa H37Rv e 3.03 a 390 μ M para a cepa pré-XDR, estes valores foram determinados a partir de três replicatas biológicas. Dentre os compostos inicialmente sintetizados, o derivado aminoalcanol, c-1, deteve uma maior potência de atividade relativa ao etambutol comparado às demais substâncias: 2,4 vezes mais ativo para a cepa sensível, e 9,5 vezes mais potente para a cepa multidroga resistente. Com relação à seletividade terapêutica, apenas os derivados aminoalcanol (c-1 e c-2) apresentaram índice de seletividade > 10 quando testados em células de linhagem renal (VERO) e hepática (HepG2).

Com o objetivo de aumentar a potência de atividade contra o bacilo bem como diminuir a moderada citotoxicidade apresentada por estas moléculas, novos compostos foram otimizados e sintetizados (tabelas 6 e 7).

Dos 22 novos compostos derivados do 2-aminoalcan-1-ol sintetizados e avaliados (tabela 6), a CIM em cepa sensível de *Mtb* apresentou variação entre 4 a > 64 μ M e, 8 a > 64 μ M para a cepa pré-XDR. A molécula o-13 apresentou melhor atividade frente à cepa sensível de *Mtb*, com concentração inibitória de 4 μ M. Já as moléculas d-7, o-11 e o-12 apresentaram uma CIM de 8 μ M tanto para a cepa sensível como para o isolado multidroga resistente. Dentre os compostos que apresentaram uma CIM duas vezes maior, as moléculas o-11 e o-12 apresentaram maior índice de seletividade de 10,31 e 18,6 vezes, respectivamente.

Dos 13 novos derivados do tipo alcan-1,2-diamina, 3 apresentaram boa atividade (tabela 8). O composto d-15 apresentou CIM de 4 μ M frente à cepa sensível e pré-XDR de *Mtb* e 7 vezes mais potente que o etambutol em cepa multirresistente.

Já as moléculas a-4 e a-5 apresentaram uma CIM de 8 μ M para ambas as cepas e atividade 3 vezes maior que o etambutol em cepa pré-XDR. Os três compostos apresentaram seletividade > 10 para a linhagem HepG2. Destes, o composto d-15 apresentou melhor seletividade para duas linhagens de célula: 39,43 para HepG2 e 8,43 para a célula Vero.

Foram sintetizados um terceiro grupo de derivados do tipo 1-aminoalcan-2-ol (tabela 8), com introdução de anel benzênico em sua estrutura genérica. Dos 6 compostos avaliados, 2 apresentaram boa atividade antimicobacteriana (2 a 8 μ M) e elevada potência de atividade relativa ao etambutol em cepa multirresistente. Os compostos o-16 e o-18 inibiram o crescimento bacteriano multidroga resistente numa concentração de 2 μ M e foram 14 vezes mais potentes que a ação do etambutol, este com CIM de 28,8 μ M, na cepa pré-XDR testada. Porém, estes compostos demonstraram elevada citotoxicidade para as 3 linhagens celulares testadas e portanto, baixos índices de seletividade.

Tabela 6 - Atividade antimicobacteriana dos derivados do tipo **2-aminoalcan-1-ol** frente a cepas de *M. tuberculosis* sensível e multirresistente expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), e citotoxicidade em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50).

1

CIM (μM)

CC50 (μM)

| Código composto | R ¹ | R ² | n | CIM (μM) | | | | CC50 (μM) | | | | | |
|-----------------|----------------|-----------------|----|-----------|------------|--------------|------------|-----------|--------------|----------|--------|-------|--------------|
| | | | | Mtb H37Rv | PE | Mtb MDR 1576 | PEr | Vero | IS | J 774A.1 | IS | HepG2 | IS |
| d-6 | H | H | 9 | 64,00 | 6 | 32 | 90 | 40,77 | 0,64 | 2,35 | 0,04 | nd | nd |
| c-1 | H | H | 13 | 1,52 | 237 | 3,03 | 950 | 124,90 | 82,17 | 10,2 | 6,71 | 129,4 | 85,13 |
| d-7 | H | H | 15 | 8 | 45 | 8 | 360 | 53,19 | 6,65 | 9,65 | 1,21 | 199,5 | 24,94 |
| d-8 | H | Et | 9 | > 64 | > 5,6 | 64 | 45 | 37,32 | < 0,58 | 10,5 | < 0,16 | nd | nd |
| o-1 | H | Et | 13 | 16 | 23 | 32 | 90 | 27,65 | 1,73 | 22,84 | 1,43 | nd | nd |
| d-9 | H | Et | 15 | 16 | 23 | 16 | 180 | 23,58 | 1,47 | 135 | 8,44 | 191,9 | 11,99 |
| o-2 | H | Bu | 9 | 32 | 11 | 32 | 90 | 25,97 | 0,81 | 21,36 | 0,67 | nd | nd |
| o-3 | H | Bu | 13 | 64 | 6 | 64 | 45 | 73,42 | 1,15 | 23,74 | 0,37 | nd | nd |
| o-4 | H | Bu | 15 | 32 | 11 | 32 | 90 | 147,50 | 4,61 | 31,13 | 0,97 | nd | nd |
| o-5 | H | Hex | 13 | 64 | 6 | 64 | 45 | 113,00 | 1,77 | 23,75 | 0,37 | nd | nd |
| o-6 | H | Dec | 13 | 64 | 6 | 64 | 45 | 103,80 | 1,62 | 55,3 | 0,86 | nd | nd |
| o-13 | H | Et ₂ | 13 | 4 | 90 | 32 | 90 | 25,06 | 6,27 | 23,32 | 5,83 | nd | nd |
| o-11 | H | Bu ₂ | 13 | 8 | 45 | 8 | 360 | 47,18 | 5,90 | 22,41 | 2,80 | 82,51 | 10,31 |
| c-2 | Bn | H | 13 | 4,5 | 80 | 4,5 | 640 | 42,18 | 9,37 | 5,94 | 1,32 | 99,16 | 22,04 |
| d-1 | Bn | H | 15 | 64 | 6 | 64 | 45 | 137,90 | 2,15 | 93,3 | 1,46 | nd | nd |
| d-2 | Bn | H | 17 | 32 | 11 | 32 | 90 | 125,70 | 3,93 | 23 | 0,72 | nd | nd |
| o-7 | Bn | Et | 13 | 16 | 23 | 16 | 180 | 26,00 | 1,63 | 21,55 | 1,35 | 237,1 | 14,82 |
| o-8 | Bn | Et | 17 | 16 | 23 | 16 | 180 | 67,82 | 4,24 | 52,27 | 3,27 | 95,11 | 5,94 |
| o-9 | Bn | Hex | 13 | 64 | 6 | 64 | 45 | 53,95 | 0,84 | 54,61 | 0,85 | nd | nd |
| o-10 | Bn | Hex | 15 | 64 | 6 | 64 | 45 | 120,30 | 1,88 | 118,1 | 1,85 | nd | nd |

Continuação: **Tabela 6** - Atividade antimicobacteriana dos derivados do tipo **2-aminoalcan-1-ol** frente a cepas de *M. tuberculosis* sensível e multirresistente expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), e citotoxicidade em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50).

1

| Código composto | CIM - µM | | | | | | CC50 - µM | | | | | | |
|---------------------|----------------------|-----------------|----|-------------|-------|--------------|------------|--------|--------------|----------|--------------|---------|-------------|
| | R ¹ | R ² | n | Mtb H37Rv | PE | Mtb MDR 1576 | PEr | Vero | IS | J 774A.1 | IS | HepG2 | IS |
| d-3 | H | Et ₂ | 9 | 64 | 6 | 32 | 90 | 36,18 | 0,57 | 17,6 | 0,28 | nd | nd |
| c-3 | H | Et ₂ | 13 | 7,75 | 46 | 7,75 | 372 | 92,28 | 11,91 | 6,54 | 0,84 | 149,6 | 19,3 |
| d-4 | H | Et ₂ | 15 | > 64 | < 5,6 | > 64 | < 45 | 85,53 | < 1,34 | 49,5 | < 0,77 | nd | nd |
| d-5 | H | Et ₂ | 17 | > 64 | < 5,6 | > 64 | < 46 | 117,00 | < 1,83 | 102 | < 1,59 | nd | nd |
| o-12 | (Bn)OMe ₃ | H | 13 | 8 | 45 | 8 | 360 | 17,69 | 2,21 | 119,5 | 14,94 | 148,8 | 18,6 |
| Etambutol (EMB) | | | | 3,6 (1) | 100 | 28,8 (8) | 100 | 641 | 178 | > 1.444 | > 401 | > 1.444 | > 401 |
| Isoniazida (INH) | | | | 0,91 (0,13) | - | 934 (128) | - | nd | - | nd | - | nd | - |
| Rifampicina (RMP) | | | | 0,04 (0,03) | - | 78 (64) | - | nd | - | nd | - | nd | - |
| Levofloxacina (LVX) | | | | 0,35 (0,13) | - | 5,5 (2) | - | nd | - | nd | - | nd | - |
| Amicacina (AMK) | | | | 0,1 (0,08) | - | 0,8 (0,63) | - | nd | - | nd | - | nd | - |

Fonte: o autor

CIM: concentração inibitória mínima; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% da população celular; R1-R2: radicais substituintes; n: quantidade de moléculas de carbono na cadeia; PE e PEr: potência do composto relativo ao etambutol [$CIM_{(etambutol)}/CIM_{(composto)} \times 100$]; IS: índice de seletividade corresponde à razão CC₅₀/CIM; nd - não determinado; Et: Etilo; Bu: Butilo; Hex: Hexilo; Dec: Decilo; Bn: Bencilo; (Bn)OMe₃: 3,4,5-trimetoxibencilo; Boc: terc-butiloxicarbonil; Ponto de corte da CIM de susceptibilidade para *Mtb* (valor em parêntese - µg/mL): EMB < (4); INH < (0,25); RMP < (0,5); LVX < (0,5); AMK < (5).

Tabela 7 - Atividade antimicobacteriana dos derivados do tipo 1,2-**alcanodiaminas** frente a cepas de *M. tuberculosis* sensível e multirresistente expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), e citotoxicidade em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50).

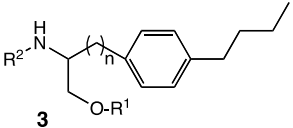
2

| Código composto | R ¹ | R ² | n | CIM (μM) | | | | CC50 (μM) | | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|----------------|----|-----------|-------|----------------|------------|-----------|--------|----------|--------|---------|--------------|
| | | | | Mtb H37Rv | PE | Mtb MDR - 1576 | PEr | Vero | IS | J 774A.1 | IS | HepG2 | IS |
| c-5 | H | Boc | 13 | 17,6 | 20 | 17,6 | 164 | 21,88 | 1,24 | 5,18 | 0,29 | nd | nd |
| c-4 | H | H | 13 | > 64 | < 5,6 | 390 | 7 | 192,20 | < 3,00 | 217,2 | < 3,39 | nd | nd |
| d-10 | H | Boc | 5 | > 64 | < 5,6 | > 64 | < 45 | 75,67 | < 1,18 | 32,8 | 0,51 | nd | nd |
| d-11 | H | Boc | 7 | > 64 | < 5,6 | 64 | 45 | 35,34 | < 0,55 | 20,7 | < 0,32 | nd | nd |
| d-12 | H | Boc | 11 | 32 | 11 | 32 | 90 | 22,00 | 0,69 | 6,2 | 0,19 | nd | nd |
| a-1 | H | Boc | 15 | 16 | 23 | 16 | 180 | 17,69 | 1,11 | 30,51 | 1,91 | 115,1 | 7,19 |
| a-2 | H | Boc | 17 | 32 | 11 | 64 | 45 | 51,39 | 1,61 | 35,96 | 1,12 | nd | nd |
| d-13 | Et | Boc | 7 | 64 | 6 | 64 | 45 | 45,16 | 0,71 | 3,92 | 0,06 | nd | nd |
| d-14 | Et | Boc | 9 | 64 | 6 | 64 | 45 | 32,34 | 0,51 | 20,9 | 0,33 | nd | nd |
| a-3 | Et | Boc | 13 | 16 | 23 | 16 | 180 | 17,69 | 1,11 | 19,77 | 1,24 | 107 | 6,69 |
| d-15 | Et | Boc | 17 | 4 | 90 | 4 | 720 | 33,70 | 8,43 | 4,7 | 1,18 | 157,7 | 39,43 |
| a-4 | Bu | Boc | 13 | 8 | 45 | 8 | 360 | 20,28 | 2,54 | 21,18 | 2,65 | 135,9 | 16,99 |
| a-5 | Hex | Boc | 13 | 8 | 45 | 8 | 360 | 22,85 | 2,86 | 20,75 | 2,59 | 86,8 | 10,85 |
| a-6 | CH ₂ COOEt | Boc | 13 | 32 | 11 | 32 | 90 | 38,96 | 1,22 | 27,88 | 0,87 | nd | nd |
| a-7 | NHR ₁ = N ₃ | Boc | 13 | > 64 | < 5,6 | 16 | 180 | 63,83 | < 1,00 | 104,3 | < 1,63 | nd | nd |
| c-6 | Et ₂ | H | 13 | 32 | 11 | 16 | 180 | 40,08 | 1,25 | 25,63 | 0,80 | nd | nd |
| | Etambutol | | | 3,6 (1) | 100 | 28,8 (8) | 100 | 641 | 178 | > 1.444 | > 401 | > 1.444 | |

Fonte: o autor.

CIM: concentração inibitória mínima; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% da população celular; R1-R2: radicais substituintes; n: quantidade de moléculas de carbono na cadeia; PE e PEr: potência do composto relativo ao etambutol [$CIM_{(etambutol)}/CIM_{(composto)} \times 100$]; IS: índice de seletividade corresponde à razão CC₅₀/CIM; nd - não determinado; Et: Etilo; Bu: Butilo; Hex: Hexilo; Dec: Decilo; Bn: Bencilo; (Bn)OMe₃: 3,4,5-trimetoxibencilo; Boc: terc-butiloxicarbonil; Ponto de corte da CIM de susceptibilidade para *Mtb* (valor em parêntese - μg/mL): EMB < (4).

Tabela 8 - Atividade antimicrobacteriana dos derivados do tipo **1-aminoalcan-2-ol** frente a cepas de *M. tuberculosis* sensível e multirresistente expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), e citotoxicidade em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50).



3

CIM (µM)

CC50 (µM)

| Código | R ¹ | R ² | n | Mtb H37Rv | PE | Mtb MDR -1576 | PEr | Vero | SI | J 774A.1 | SI | HepG2 | IS |
|-----------|----------------|----------------|---|-----------|-----|---------------|-------------|-------|------|----------|-------|---------|-------|
| o-14 | H | H | 4 | 64 | 6 | 64 | 45 | 27,83 | 0,43 | 10,7 | 0,17 | nd | nd |
| o-16 | H | H | 6 | 4 | 90 | 2 | 1440 | 21,24 | 5,31 | 10,61 | 2,65 | 25,39 | 6,35 |
| o-18 | H | H | 8 | 8 | 45 | 2 | 1440 | 25,39 | 3,17 | 11,74 | 1,47 | 45,65 | 5,71 |
| o-15 | H | Boc | 4 | 64 | 6 | 16 | 180 | 51,48 | 0,80 | 14,22 | 0,22 | nd | nd |
| o-17 | H | Boc | 6 | 32 | 11 | 16 | 180 | 28,28 | 0,88 | 12,94 | 0,40 | nd | nd |
| o-19 | H | Boc | 8 | 32 | 11 | 16 | 180 | 30,97 | 0,97 | 15,81 | 0,49 | nd | nd |
| Etambutol | | | | 3,6 (1) | 100 | 28,8 (8) | 100 | 641 | 178 | > 1.444 | > 401 | > 1.444 | > 401 |

Fonte: o autor.

CIM: concentração inibitória mínima; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% da população celular; R1-R2: radicais substituintes; n: quantidade de moléculas de carbono na cadeia; PE e PEr: potência do composto relativo ao etambutol [$CIM_{(etambutol)}/CIM_{(composto)} \times 100$]; IS: índice de seletividade corresponde à razão CC₅₀/CIM; nd - não determinado; Et. Etilo; Bu: Butilo, Hex: Hexilo, Dec: Decilo; Bn: Bencilo; (Bn)OMe₃: 3,4,5-trimetoxibencilo; Boc: terc-butiloxicarbonil; Ponto de corte da CIM de susceptibilidade para *Mtb* (valor em parêntese - µg/mL): EMB < (4).

6.1.1 Espectro de atividade antibacteriana

Foram selecionados 25 compostos que apresentaram menor grau de citotoxicidade ($CC_{50} \geq 100 \mu\text{M}$) para avaliar o espectro de ação antibacteriana. Para esta finalidade utilizamos o *Mycobacterium smegmatis* como microrganismo representativo das micobactérias não-tuberculosas (MNT), *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* como modelo de estudo de bactérias Gram positiva e Gram negativa, respectivamente.

Os compostos selecionados apresentaram atividade inibitória frente o *M. smegmatis*, com CIM variando entre 8 a 512 μM . Dentre estes, o composto a-1 apresentou maior atividade com CIM de 8 μM bem como os compostos c-2, o-12 e d-15 com CIM de 16 μM . Observamos, também, que os mesmos compostos apresentaram boa atividade frente ao *S. aureus* com concentrações variando em 2 a 8 vezes. Dentre estes, o o-12 demonstrou a menor CIM ($\leq 4 \mu\text{M}$) do grupo dos derivados 2-aminoalcan-1-ol, e o composto a-3 com a mesma atividade e representando os derivados alcanodiaminas. Ambos os grupos de compostos apresentaram baixa ou nula atividade contra a *K. pneumoniae* com a menor CIM de 128 μM para o derivado c-2.

Tabela 9 – Avaliação de espectro antibacteriano de derivados **2-aminoalcan-1-ol** e **alcanodiaminas** determinados através da concentração inibitória mínima.

| Composto | CIM - μM | | | |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv | <i>M. smegmatis</i> ATCC 607 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 |
| c-1 | 1,52 | 128 | 16 | 512 |
| d-7 | 8 | 256 | 256 | > 512 |
| d-9 | 16 | 64 | 32 | 512 |
| o-4 | 32 | 512 | 512 | > 512 |
| o-5 | 64 | 256 | 128 | > 512 |
| o-6 | 64 | 128 | 512 | > 512 |
| o-11 | 8 | > 512 | nd | nd |
| c-2 | 4,5 | 16 | 16 | 128 |
| d-1 | 64 | > 512 | > 512 | > 512 |
| d-2 | 32 | 256 | > 512 | > 512 |
| o-7 | 16 | 32 | 16 | > 512 |
| o-8 | 16 | 128 | > 512 | > 512 |
| o-10 | 64 | > 512 | > 512 | > 512 |

Continuação: **Tabela 9** - Avaliação de espectro antibacteriano de derivados **2-aminoalcan-1-ol** e **alcanodiaminas** determinados através da concentração inibitória mínima.

| Composto | CIM - μM | | | |
|-------------|--|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| | <i>M. tuberculosis</i> <i>H37Rv</i> | <i>M. smegmatis</i> ATCC 607 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 |
| c-3 | 8 | 512 | > 512 | > 512 |
| d-4 | > 64 | > 512 | > 512 | > 512 |
| d-5 | > 64 | > 512 | > 512 | > 512 |
| o-12 | 8 | 16 | ≤ 4 | 512 |
| c-4 | > 64 | 512 | > 512 | > 512 |
| d-10 | > 64 | 512 | 512 | > 512 |
| a-1 | 16 | 8 | 16 | > 512 |
| a-3 | 16 | 32 | ≤ 4 | 512 |
| d-15 | 4 | 16 | 256 | > 512 |
| a-4 | 8 | 32 | 16 | > 512 |
| a-5 | 8 | 128 | 256 | > 512 |
| a-7 | > 64 | > 512 | > 512 | > 512 |
| Rifampicina | 0,04 | 19,5 | nd | nd |
| Amicacina | 0,1 | 1 | nd | nd |
| Oxacilina | nd | nd | 0,25 | nd |
| Ceftazidima | nd | nd | nd | 0,5 |

Fonte: o autor.

Amicacina, oxacilina e ceftazidima expressas em " $\mu\text{g/mL}$ ", de acordo com o CLSI (2018). nd: não determinado. Ponto de corte de susceptibilidade para microrganismos relacionados: amicacina $\leq 16 \mu\text{g/mL}$, oxacilina $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ e ceftazidima $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ (ALCAIDE et al., 2017; CLSI, 2018b)

6.2 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA *IN VITRO*

Com o intuito de determinar o tipo de interação farmacológica dos compostos sintetizados na presença de antimicrobianos de primeira linha (RMP, EMB, INH) e de segunda linha (AMK e LFX), utilizamos o método *checkerboard bidimensional* em microplacas de 96 poços. Foram selecionados os compostos que obtiveram uma CIM menor que $10 \mu\text{M}$, maior potência de atividade relativa ao EMB e índice de seletividade > 10 em 2 linhagens celulares.

Através do índice de concentração inibitória fracionada (FICI) foi possível determinar a interação entre as moléculas como sinérgica, aditiva ou antagônica. Dos 5 compostos sintetizados ensaiados nenhum apresentou efeito antagônico na inibição das cepas sensível e multirresistente de *Mtb*. Contudo foi observada uma interação aditiva para a maior parte dos antimicrobianos estudados. O FICI para aditividade variou em 0,53 a 1,5 para a isoniazida, etambutol, amicacina e levofloxacina, quando

combinado com os compostos (tabela 10) e este efeito foi observado tanto para a cepa sensível como para a cepa pré-XDR de *Mtb*.

Tabela 10 - Concentração inibitória fracionada resultante da interação *in vitro* dos compostos selecionados e antimicrobacterianos de primeira e segunda linha em cepas de *M. tuberculosis*.

| Composto | Antimicrobiano | <i>Mtb</i> H37Rv | | <i>Mtb</i> Pré-XDR 1576 | |
|----------|----------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| | | Combinação FIC A / FIC C | FIC <i>index</i> | Combinação FIC A / FIC C | FIC <i>index</i> |
| c-1 | RMP | 0,125 / 0,25 | 0,38 | 0,031 / 0,5 | 0,53 |
| | INH | 0,50 / 0,25 | 0,75 | 0,125 / 0,5 | 0,63 |
| | EMB | 0,125 / 0,5 | 0,63 | 0,25 / 0,5 | 0,75 |
| | AMK | 0,063 / 0,5 | 0,56 | 0,25 / 0,5 | 0,75 |
| | LFX | 0,031 / 0,5 | 0,53 | 0,5 / 0,5 | 1 |
| c-2 | RMP | 0,063 / 0,5 | 0,56 | 0,0625 / 0,5 | 0,56 |
| | INH | 0,50 / 0,25 | 0,75 | 0,125 / 0,5 | 0,63 |
| | EMB | 0,5 / 0,5 | 1 | 1,0 / 0,5 | 1,5 |
| | AMK | 0,25 / 0,5 | 0,75 | 0,125 / 0,5 | 0,63 |
| | LFX | 0,5 / 0,25 | 0,75 | 0,5 / 0,5 | 1 |
| c-3 | RMP | 0,25/0,25 | 0,5 | 0,5 / 0,25 | 0,75 |
| | EMB | 0,5/0,03 | 0,53 | 0,125 / 0,5 | 0,63 |
| | INH | 0,5/0,03 | 0,53 | 0,5 / 0,5 | 1 |
| | AMK | 0,5/0,5 | 1 | 0,125 / 0,5 | 0,63 |
| | LFX | 0,5/0,03 | 0,53 | 0,25 / 0,5 | 0,75 |
| o-12 | RMP | 0,25/0,25 | 0,5 | 0,25 / 0,25 | 0,5 |
| | EMB | 0,5/0,0125 | 0,63 | 0,25 / 0,5 | 0,75 |
| | INH | 0,5/0,125 | 0,63 | 0,5 / 0,5 | 1 |
| | AMK | 0,5/0,126 | 0,63 | 0,25 / 0,5 | 0,75 |
| | LFX | 0,5/0,127 | 0,63 | 0,5 / 0,5 | 1 |

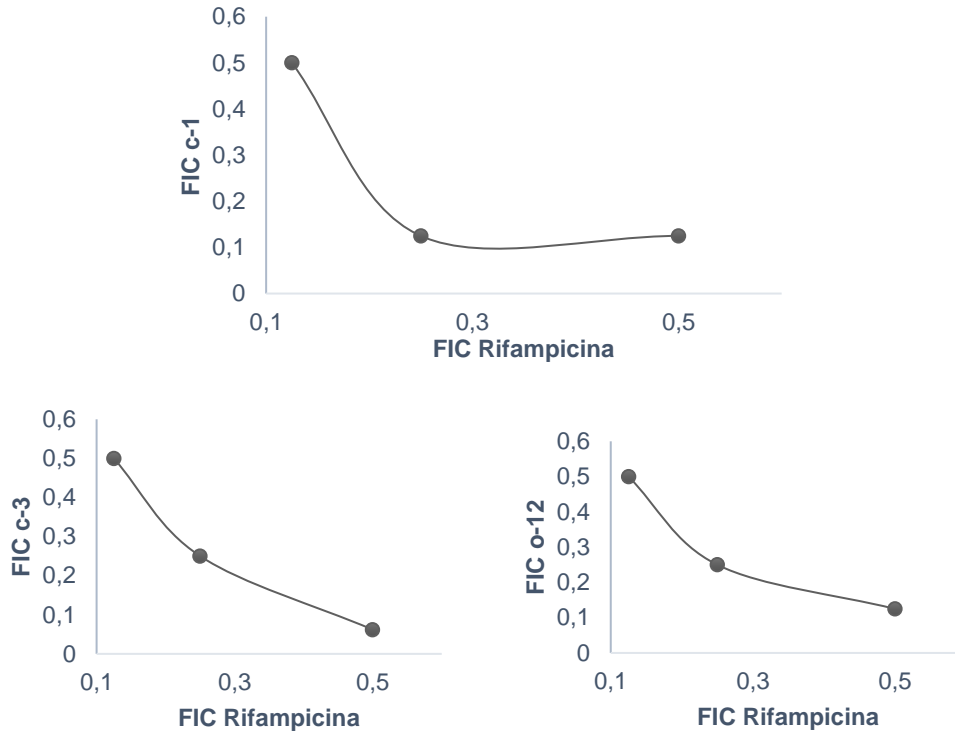
Fonte: o autor.

RMP: rifampicina; EMB: etambutol; INH: isoniazida; AMK: amicacina; LFX: levofloxacina; FIC: concentração inibitória fracionada.

O efeito sinérgico foi observado na combinação da rifampicina com os compostos c-1, c-3 e o-12 em cepa sensível de *Mtb*. Para a cepa multi-resistente o efeito sinérgico com a rifampicina só foi mantido para o derivado o-12. Tal interação provocou uma redução mínima de 75% na concentração necessária para inibir o crescimento do bacilo, e esta ocorreu tanto para a rifampicina quanto para o composto o-12 (FICI = 0,5). A maior redução observada (87,5%) ocorreu na cepa H37Rv, através da interação do composto c-1 com a rifampicina e assim resultando no valor de FICI

de 0,38. As interações sinérgicas foram representadas através de isobogramas na figura 10.

Figura 10 - Isobogramas representando a interação do tipo sinérgica dos compostos sintetizados com a Rifampicina, contra o *M. tuberculosis* H37Rv.



Fonte: O autor.

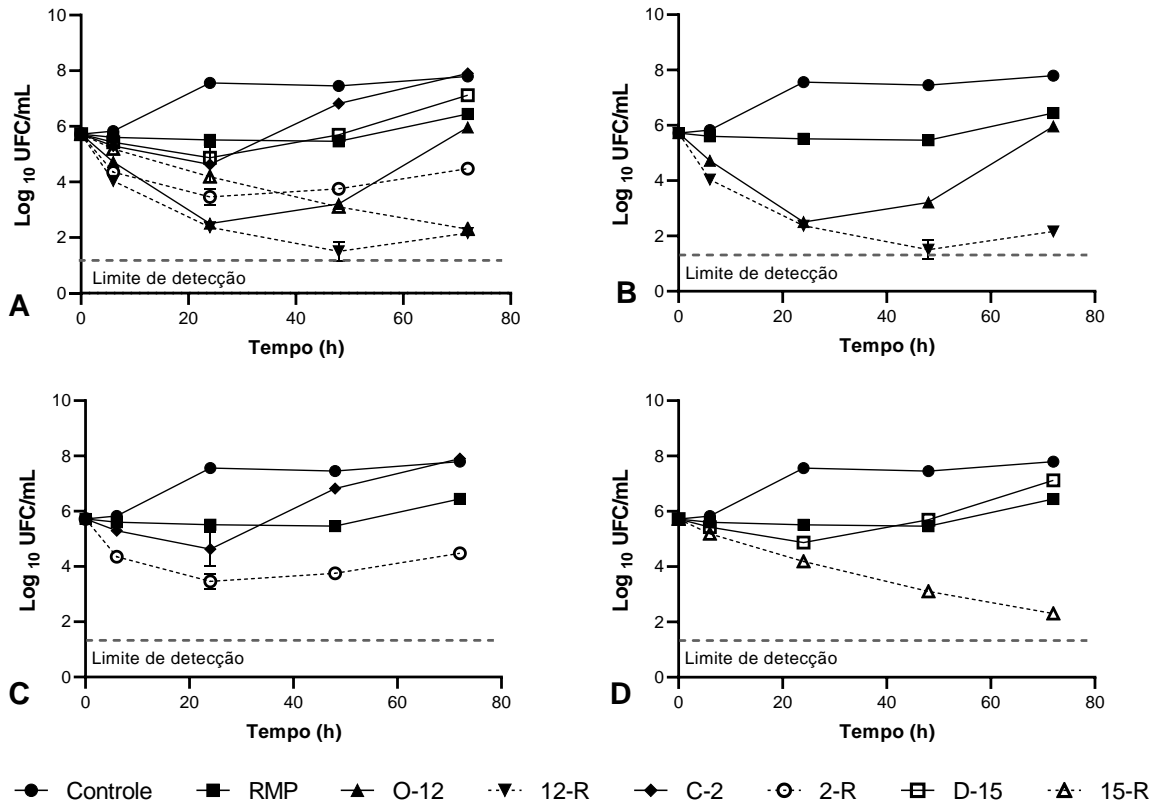
6.3 CINÉTICA DE MORTE

Utilizamos o método da cinética de morte do *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*) como modelo para avaliar a dinâmica do efeito dos compostos em relação ao tempo. Bem como analisar e confirmar a interação sinérgica indicada pelos resultados obtidos através do método checkerboard. A seleção dos compostos para esta análise levou em consideração os parâmetros de CIM < 20 μ M para o *M. smegmatis* e IS maior ou próximo de 10 em duas linhagens celulares.

A cinética de morte para os compostos c-2, o-12 e d-15 foram representadas na figura 11-A e foram utilizadas as concentrações de 16 μ M para todos os compostos (1 x CIM). Sem a presença de composto ou fármaco, a densidade de *Msm* na cultura aumentou de 5×10^5 para $6,4 \times 10^7$ UFC/mL em 72h de observação. Na concentração

de 19,5 μM de rifampicina isolada, houve uma redução de 27% da viabilidade bacteriana durante 24h de contato. Contudo, a partir desse período ocorreu um aumento gradativo na contagem de UFC/mL.

Figura 11 - Influência dos derivados **2-aminoalcan-1-ol** e **alcanodiaminas** na cinética de morte do *M. smegmatis*.



Fonte: O autor.

Legenda: A) Sobreposição das curvas de morte dos compostos o-12, c-2, d-15 e combinados com rifampicina. B) Curva de morte do composto o-12 isolado e combinado com rifampicina; C) Curva de morte do composto c-2 isolado e combinado com rifampicina; D) Curva de morte do composto d-15 isolado e combinado com rifampicina.

O composto o-12 (figura 11-B) demonstrou efeito tempo-dependente, no qual a partir de 24h de exposição foi alcançado > 99% de morte. Este efeito permanece durante 48h de exposição e seguido de uma recuperação do crescimento, mas ainda assim com manutenção do efeito inibitório. A combinação do composto o-12 com rifampicina (12-R) demonstrou um efeito bactericida a partir de 24 horas de contato e esta atividade permaneceu durante todo o período de exposição. Ao final das 72h, a inibição foi maior que 99,9% em relação ao controle e esta interação foi avaliada como

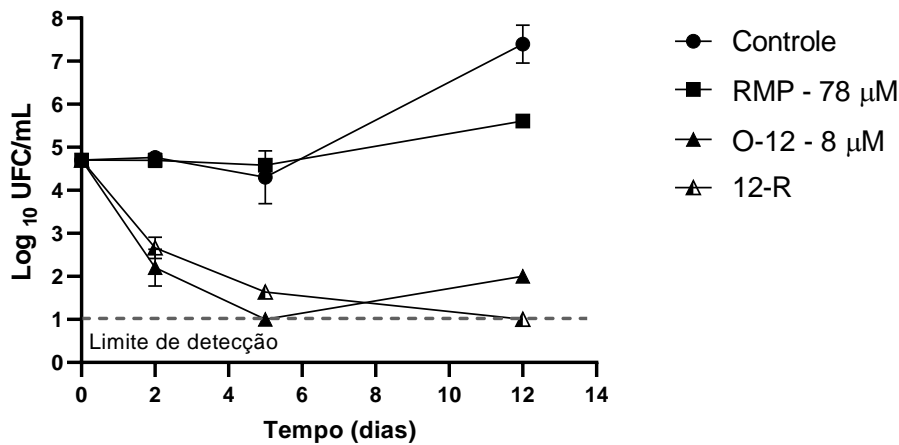
sinérgica por apresentar uma redução maior que $2 \log_{10}$ nas UFC/mL quando comparado ao efeito do melhor agente inibidor isolado.

O derivado c-2 (figura 11-C) apresentou redução de 98,6% na densidade bacteriana após 24h de exposição, contudo esse efeito inibitório foi reduzindo ao longo do tempo, com recuperação do crescimento micobacteriano, ao ponto que em 72h de contato a viabilidade bacteriana foi comparável ao controle. Na combinação do c-2 com a rifampicina (2-R) foi observado uma redução da população bacteriana maior que 99% e este efeito permaneceu ao longo das 72h de tratamento. A interação do composto c-2 com rifampicina foi considerada sinérgica e de efeito bactericida.

Com relação ao composto d-15 (figura 11-D), observamos que nas primeiras 24h ocorreu redução maior que 99% da viabilidade da cultura e que este grau de redução não foi mantido ao longo do tempo. Isoladamente, o composto apresentou um efeito bacteriostático. De modo diferente, ao combinar com rifampicina foi observado, também, um efeito sinérgico entre os agentes. Ocorreu uma interação sinérgica a partir de 48h de contato, onde observamos uma redução de $2,6 \log_{10}$ na contagem bacteriana e esta interação se manteve até as 72h de exposição.

Como o composto o-12 apresenta efeito sinérgico combinado com a rifampicina, na metodologia de *checkerboard* para a cepa sensível e pré-XDR de *Mtb*, e efeito sinérgico na cinética de morte em *M. smegmatis*, decidimos avaliar a dinâmica de ação ao longo do tempo na cepa pré-XDR de *Mtb*. Durante 12 dias foi avaliado a cinética de crescimento do isolado clínico livre de agentes com atividade antimicobacteriana (controle) e na presença do composto o-12 na concentração inibitória mínima de $8 \mu\text{M}$, isolado e combinado com a rifampicina ($78 \mu\text{M}$), figura 12. A partir do segundo dia de exposição foi possível observar o início do efeito bactericida, tanto para o derivado o-12 isolado quanto para a combinação com rifampicina. Essa redução foi maior que 99% na contagem das UFCs e mantiveram-se diminuídas ao longo do tempo, chegando a uma redução máxima de $\geq 99,9\%$ em 12 dias. Entretanto, para este isolado clínico de *Mtb* não foi possível observar interação sinérgica entre a combinação dos agentes. Encontrou-se uma diferença de $1 \log_{10}$ na contagem das UFC/mL quando comparado entre os agentes combinados e isolados, demonstrando uma interação do tipo aditiva ou indiferente.

Figura 12 – Dinâmica de ação do composto o-12 isolado e em combinação com rifampicina na cinética de morte do isolado clínico pré-XDR (1576) do *M. tuberculosis*.



Fonte: O autor.

Composto o-12 isolado (8 µM), rifampicina isolada (RMP – 78 µM) e o-12 combinado com rifampicina (12-R: 8 µM + 78 µM (64 µg/mL)).

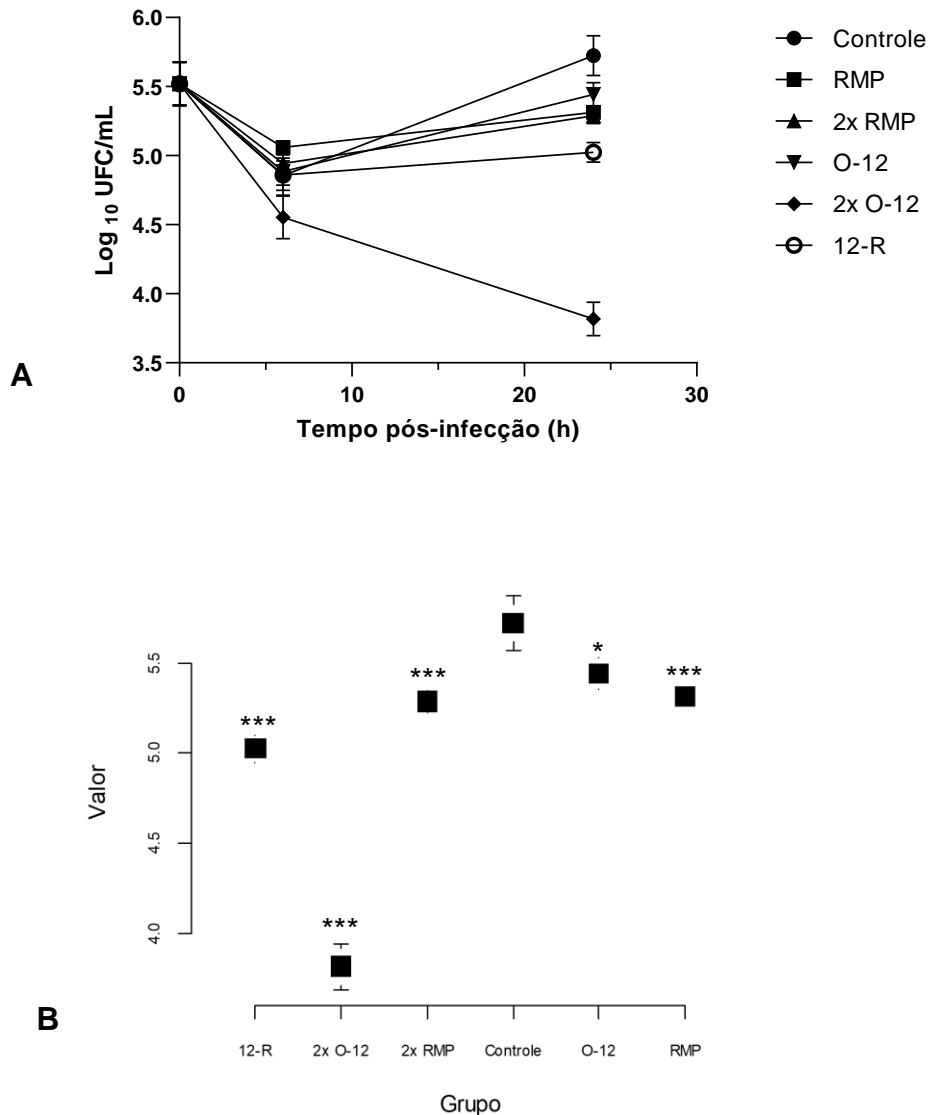
6.4 ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA INTRACELULAR

O derivado o-12 foi selecionado para ser analisado quanto a atividade sobre a viabilidade intracelular do bacilo, considerando-se os resultados obtidos em relação a atividade antimicobacteriana para o *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, e o índice de seletividade em macrófago J774. Para averiguar tal efeito, utilizamos como hospedeiro a linhagem de macrófago J774 para ser infectada com *M. smegmatis* e em seguida receber tratamento utilizando concentrações de 1 a 2 vezes a CIM de cada agente inibidor: 16 e 32 µM do o-12 isolado, 19,5 e 39 µM de rifampicina, e uma combinação de 16 µM do composto com 19,5 µM de rifampicina. Essas concentrações foram selecionadas com base nos resultados da CIM em *M. smegmatis* (tabela 9).

Após 6 horas de tratamento, houve redução (6,2%) na contagem dos bacilos intracelulares apenas nas amostras tratadas com o composto o-12 a 32 µM, porém não foi estatisticamente significativa (figura 13-A). Durante as 24 horas de tratamento a rifampicina isolada não demonstrou diferença significativa, quando comparada entre si, em nenhuma das concentrações testadas (19,5 e 39 µM); porém houve redução estatisticamente significativa quando comparada ao controle. O composto o-12, nas duas concentrações testadas, apresentou redução estatisticamente significativa. Contudo, ao ser utilizado uma concentração 2 vezes maior que a CIM do composto o-

12, esta condição apresentou também uma redução biológica significativa de 33,3% (redução de 1,9 log UFC/mL, $p = 0,00029$) das bactérias intracelulares (figura 13-B).

Figura 13 - Atividade antimicobacteriana intracelular do composto o-12, livre e associado, em macrófago J774 infectado com *M. smegmatis*.



Fonte: O autor.

Legenda: A) Quantificação de bacilos intracelulares após tempo de tratamento de 6 e 24h com rifampicina (19,5 e 39 μM), o-12 (16 e 32 μM) e o-12 associado com rifampicina (12R - 16 μM + 19,5 μM , respectivamente). B) ecuperação de bacilos intracelulares após 24 h de tratamento. Dados demonstrados a partir da média e desvio padrão, valor p em relação ao controle "****" $p = 0$; "**" $p = 0,01$.

Avaliamos, também, o tratamento associado da rifampicina e o-12, ambos na CIM, e foi observado uma redução significativa estatisticamente de 12,2% ($p = 0,000294$) na carga bacteriana intracelular. Ao comparar as amostras tratadas com a

associação do o-12 e rifampicina (12-R) e o-12 isolado, foi observado uma redução estatisticamente significativa ($p > 0,05$), todavia não foi uma redução biologicamente significativa ($> 1 \log \text{UFC/mL}$). Portanto, não foi demonstrada uma interação sinérgica na condição analisada de tempo e concentração sobre os bacilos internalizados.

6.5 ANCORAGEM MOLECULAR

Com a finalidade de investigar o possível alvo de ação, iniciamos estudos de modelagem molecular com a proteína MmpL3 do *Mycobacterium sp.* O modo de ligação dos compostos foi determinado pela maior pontuação dentre as soluções possíveis para cada ligante (tabela 11). O estudo foi iniciado utilizando como parâmetro de ligação o composto antimicobacteriano co-cristalizado com a enzima, o SQ-109. A pontuação mais alta (116,3) foi obtida para o composto o-8, enquanto o fármaco SQ-109 demonstrou score de 102,81.

A figura 14-a demonstra a superposição das melhores soluções de ancoragem dos compostos avaliados. Dentre os compostos que apresentaram boa atividade contra o organismo inteiro e maior seletividade (menor citotoxicidade), o c-2, d-15 e o-12 apresentaram score de ligação de 100,4; 98,17 e 88,4, respectivamente.

Uma análise de interação intermolecular foi realizada com os compostos que apresentaram maior atividade antimicobacteriana e maior afinidade com a proteína (figura 14 b-e). Foi evidenciado um maior contato do tipo hidrofóbico entre os resíduos da proteína com os compostos.

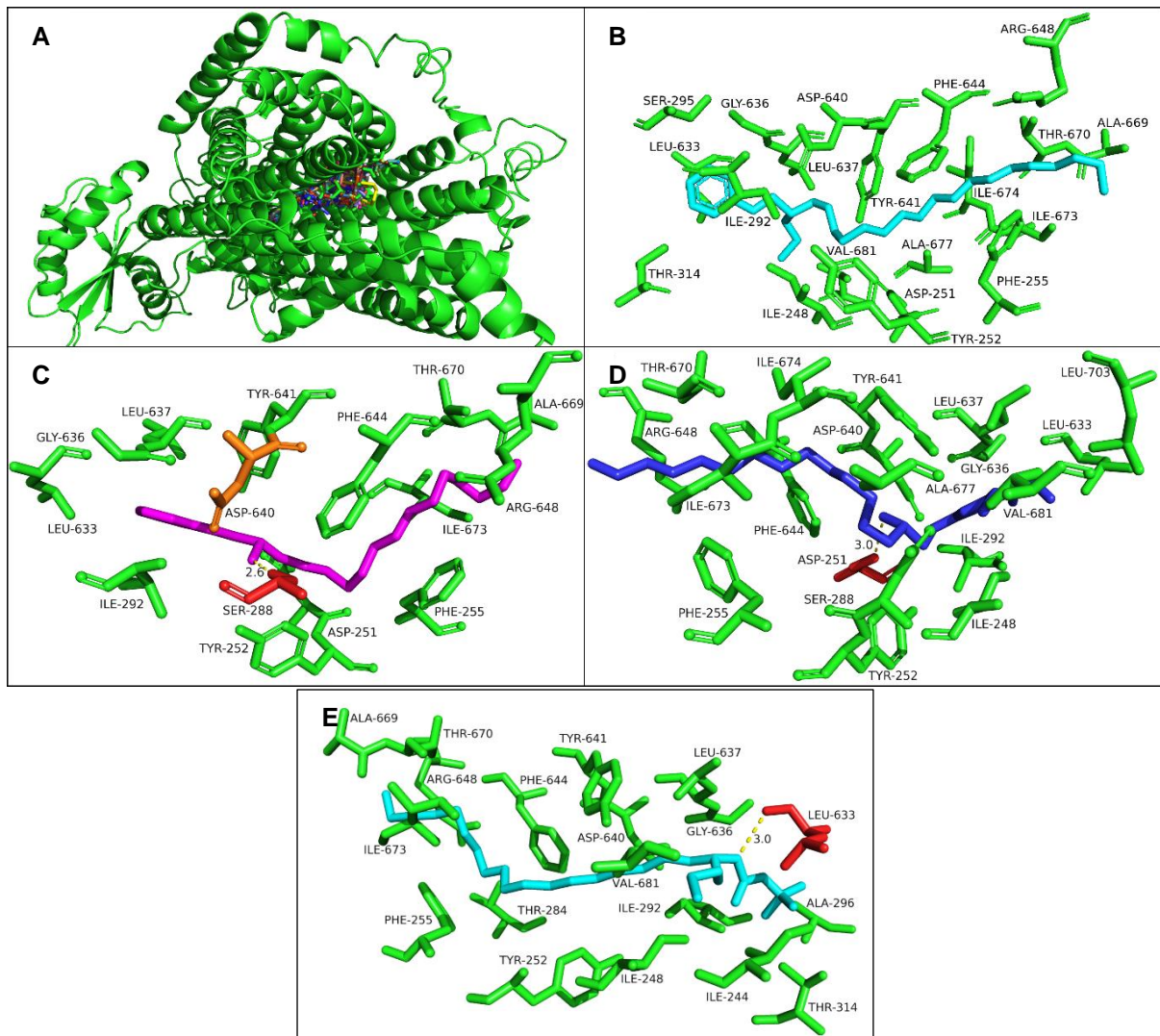
Para compreender o modo de ligação destas no sítio de ação, foi conduzido uma investigação das interações intermoleculares. Na figura 14 são evidenciados os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação entre a MmpL3 e as moléculas o-8, c-2, o-12 e d-15. Através desse modelo foi possível evidenciar diferentes modos de ligação destes compostos. Os resíduos da proteína que participam com interações do tipo hidrofóbicas estão evidenciados em verde, os que fazem ligações de hidrogênio estão em vermelho e as pontes salinas evidenciadas na cor laranja.

Tabela 11 - Valores de score (ChemPLP) para as soluções de docking dos compostos sintetizados em seus respectivos isômeros R e S.

| Composto | Score (ChemPLP) | | Composto | Score (ChemPLP) | |
|----------|-----------------|--------------|----------|-----------------|--------------|
| | R | S | | R | S |
| o-8 | 112,25 | 116,3 | o-12 | 87,33 | 88,41 |
| o-6 | 106,69 | 107,59 | d-7 | 87,3 | 85,26 |
| d-2 | 105,31 | 101,8 | c-6 | 86,62 | 85,22 |
| o-10 | 101,61 | 105,31 | o-15 | 85,81 | 91,84 |
| d-1 | 101,38 | 100,02 | d-14 | 85,15 | 81,75 |
| o-5 | 100,88 | 98,55 | o-1 | 85,1 | 80,92 |
| c-2 | 100,4 | 98,81 | c-3 | 84,55 | 88,05 |
| o-9 | 99,7 | 102,16 | a-1 | 83,75 | 90,81 |
| o-17 | 99,02 | 100,07 | o-13 | 83,36 | 90,98 |
| o-18 | 98,79 | 98,75 | c-5 | 83,3 | 85,61 |
| a-5 | 98,29 | 88,62 | d-12 | 81,29 | 80,15 |
| o-7 | 96,64 | 111,48 | c-4 | 80,5 | 77,99 |
| o-11 | 96,48 | 101,53 | d-13 | 78,91 | 76,65 |
| d-5 | 95,84 | 90,74 | c-1 | 76,1 | 78,15 |
| o-4 | 93,21 | 94,72 | d-3 | 75,43 | 73,32 |
| a-3 | 91,31 | 94,14 | o-14 | 75,36 | 85,68 |
| o-15 | 91,3 | 96,07 | a-6 | 75,31 | 76,48 |
| o-16 | 91,21 | 88,06 | d-11 | 74,95 | 72,06 |
| a-2 | 90,82 | 91,81 | o-2 | 74,89 | 81,57 |
| d-15 | 90,36 | 98,17 | a-7 | 73,99 | 72,65 |
| d-4 | 89,4 | 86,56 | d-8 | 68,91 | 66,37 |
| d-9 | 88,84 | 90,67 | d-10 | 67,54 | 69,09 |
| o-3 | 88,44 | 92,49 | d-6 | 61,13 | 62,21 |
| a-4 | 88,13 | 80,98 | SQ109 | 102,81 | |
| | | | EMB | 61,52 | |

Fonte: O autor.

Figura 14 - Sobreposição das melhores soluções de docking para cada um dos compostos utilizados neste estudo no sítio ativo da proteína mmpL3.



Fonte: O autor.

Legenda: (A) e as interações intermoleculares ocorridas entre os aminoácidos presentes no sítio ativo da proteína e os compostos (B) o-8 (ciano), (C) c-2 (magenta), (D) o-12 (roxo) e (E) d-15 (ciano). Os contatos hidrofóbicos estão na cor verde, ligações de hidrogênio em vermelho e pontes salinas em laranja.

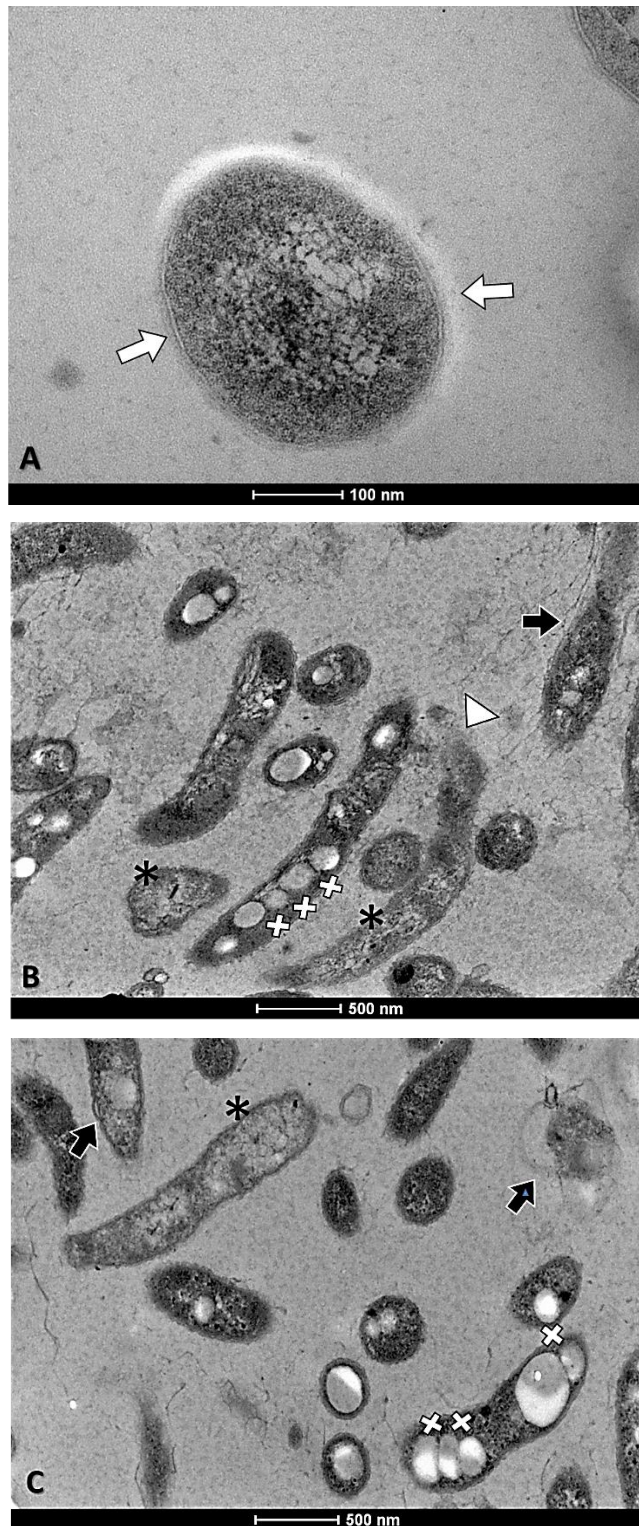
6.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Dando continuidade à investigação a cerca do mecanismo de ação, tivemos por objetivo identificar possíveis alterações provocadas pelo composto o-12 na ultraestrutura do *M. tuberculosis* e para isto, realizamos a análise da cultura de *Mtb H37Rv* através da microscopia eletrônica de transmissão.

Através das micrografias obtidas, observamos células micobacterianas não tratadas (figura 15-A) e tratadas com inibidores numa concentração igual à CIM (figura

15 B-C). A cultura micobacteriana que não recebeu tratamento apresentou uma estrutura organizada, com os limites de membrana e parede celular preservados (seta branca), como evidenciado na figura 15-A. Após o período de exposição da cultura de *Mtb* a 1 $\mu\text{g/mL}$ de etambutol, observamos a ocorrência de algumas alterações na morfologia bacteriana. Tais alterações na ultraestrutura do bacilo estão evidenciadas na figura 15-B e foram do tipo: extrusão de material citosólico (marcado com asterisco), ruptura e descontinuidade do envelope bacteriano (triângulo); e aumento de inclusões lipídicas (x). De modo interessante, achados semelhantes foram observados na figura 15-C, onde houve a exposição da cultura bacilar ao composto o-12. Foi evidenciado, principalmente, lesões na integridade da parede bacteriana com a perda de material citosólico. As inclusões lipídicas também foram observadas nas células tratadas com esse composto.

Figura 15 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.



Legenda: A) Controle - *M. tuberculosis* H37Rv sem tratamento; B) tratado com 1 x CIM do EMB; C) tratado com 1 x CIM do composto o-12. Marcação gráfica: (seta branca) – parede celular conservada; (*) – perda de conteúdo citosólico; (seta) – parede celular destacada dos demais componentes celulares; (triângulo) – local de ruptura e descontinuidade da célula com extravasamento de material citosólico; (X) inclusão lipídica intracitoplasmática.

7 DISCUSSÃO

A tuberculose, embora seja uma doença prevenível e curável, provoca a morte de aproximadamente quatro mil pessoas por dia a nível mundial. Aliado a isso, o preocupante aumento de casos de resistência, e multirresistência, em pacientes recém diagnosticados, bem como o limitado arsenal antimicobacteriano disponível, impulsionam a pesquisa por novos medicamentos e esquemas de tratamento (WHO, 2020). Nesse contexto, no presente estudo descrevemos o potencial *in vitro* dos análogos à diidroesfingosina e do etambutol contra cepas de micobactérias, sensível e multidroga resistente.

Na perspectiva de buscar novos protótipos ao combate da doença, diversas metodologias são utilizadas. Muitas dessas abordagens englobam desde triagens *in silico* e *in vitro* na tentativa de demonstrar a atividade antimicrobiana e explicar os mecanismos de ação envolvidos, seguindo para os ensaios *in vivo*. Dentre as abordagens *in vitro*, utilizando ensaios baseados em células bacterianas inteiras, temos a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Esse é um parâmetro fundamental a ser avaliado, uma vez que se pode indicar compostos *hits* com potencial para otimização estrutural, para utilização em ensaios *in vivo* e posterior estudo clínico (COOPER, 2013). O sucesso dessas abordagens é sustentado pela descoberta de novos antimicobacterianos lançados no mercado, como a Bedaquilina que foi otimizada a partir de compostos *hits* contra *M. smegmatis* e, subsequentemente, desenvolvida como um agente anti-tuberculose multidroga resistente (COHEN, 2013).

Observou-se nesse estudo que alguns compostos das séries aminoálcoois (análogos a diidroesfingosina) e diaminas (análogos ao etambutol), demonstraram além de boa atividade antimicobacteriana, uma maior potência de atividade inibidora quando comparado ao etambutol em isolado clínico de *M. tuberculosis* multidroga resistente. De acordo com a classificação utilizada por Ramón-García e colaboradores (2016), os compostos inéditos avaliados no presente estudo apresentaram boa atividade antimicobacteriana, considerando $CIM \leq 8 \mu\text{g/mL}$. Isso foi observado para as substâncias representativas das três séries, ou seja: o-12 (3,5 $\mu\text{g/mL}$), d-15 (1,76 $\mu\text{g/mL}$) e o-16 (1,1 $\mu\text{g/mL}$).

Dos 47 compostos avaliados no presente estudo, 9 deles haviam sido descritos e avaliados anteriormente por Del Olmo e colaboradores (2009a) quanto à presença

de atividade frente ao *Mtb*. Neste estudo, de modo geral, observou-se uma similaridade entre os valores de CIM obtidos para os compostos não inéditos. Porém, foi observado que 3 substâncias (c-4, c-6 e o-13) apresentaram maior diferença de valores de CIM, na qual houve uma faixa de variação entre 4 a ~30 vezes. Embora tenha sido demonstrado uma maior potência de atividade no estudo de Del Olmo e colaboradores (2009a), os mesmos compostos foram solubilizados em uma maior concentração de DMSO comparada a utilizada no presente trabalho. Foi demonstrado que, mesmo em concentração sub-inibitória (2,5%), o DMSO é capaz de atuar de forma sinérgica com antibióticos e, por sua vez, diminuir o valor de CIM e aumentar a potência de atividade do composto (JAGANNATH; REDDY; GANGADHARAM, 1995). Esse fato pode justificar a completa solubilização das substâncias; contudo, com uma maior chance de interferência do DMSO em aumentar a potência de atividade, como observado no estudo de Del Olmo e colaboradores (2009a).

Os análogos a diidroesfingosina (c-2, o-12, o-16) e diamina (d-15) avaliados no presente estudo, compartilham um núcleo estrutural semelhante e correlato com o etambutol, um fármaco do tipo etilenodiamina que inibe enzimas do tipo arabinosiltransferases (embCAB) (SAFI et al., 2010). Essa inibição enzimática acarreta o bloqueio da biossíntese de arabinogalactanos e lipoarabinomananas, componentes estruturais da parede celular micobacteriana (ZHANG et al., 2020). A presença desse núcleo estrutural nos análogos, além de conservar nos compostos inéditos boa atividade antimicobacteriana, também demonstra propriedades almeçadas na descoberta de substâncias protótipos.

Outro aspecto a se considerar na avaliação de inibidores micobacterianos é a presença ou não da resistência cruzada aos novos compostos (INOYAMA et al., 2018). E, de modo interessante, foi observado a permanência do mesmo grau de atividade inibitória desses análogos em isolado clínico de *Mtb* (1576) que intrinsecamente detém diversos mecanismos de resistência aos fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento usual para tuberculose. Isso nos leva a inferir que essas substâncias detém um mecanismo de ação inibitório diferente dos fármacos de uso clínico e, conseqüentemente, supera a problemática da resistência cruzada. Com relação à presença de atividade inibidora frente a outras bactérias, foi observado que os compostos o-12 e d-15 apresentaram boa atividade anti estafilocócica (CIM \leq 1,76 μ g/mL). A presença de boa atividade frente à micobactéria e *S. aureus* foi documentada para alguns compostos, entre eles o SQ-109 e vacquinol (FENG et al.,

2015). Entretanto, devido ao prolongado tratamento da tuberculose é preferível a busca por novos agentes com reduzido espectro de ação antibacteriana, para evitar o risco de induzir bactérias Gram positivas a se tornarem tolerantes e até mesmo o desenvolvimento de resistência cruzada (GRZELAK et al., 2019).

Um outro parâmetro importante a ser avaliado na busca de um novo protótipo é a citotoxicidade. Com essa finalidade, diferentes linhagens celulares representativas foram utilizadas como a J774 (macrófago), Vero (epitélio renal) e HepG2 (hepatócito). A partir dessa informação é determinado o Índice de Seletividade (IS), outro parâmetro que se considera para avançar nos testes pré-clínicos, sobretudo para os testes *in vivo*, como a toxicidade aguda e avaliação de eficácia em modelo de infecção animal. Desse modo, os compostos do tipo aminoalcanóis e diaminas apresentaram seletividade terapêutica importante para as células testadas (IS > 10) (SHARMA et al., 2011). Apesar de serem menos seletivos quando comparados ao etambutol (IS > 178), foram semelhantes aos análogos 1,2-etilenodiaminas sintetizados e que identificou o protótipo SQ-109. Esse protótipo apresentou IS = 16,7 para a linhagem HepG2 (PROTOPOPOVA et al., 2005a), e encontra-se atualmente na fase 2 de estudo clínico para tratamento de tuberculose MDR (CHETTY et al., 2017).

Outras propriedades farmacológicas observadas no estudo foram a capacidade de interação sinérgica ou aditiva entre os compostos e fármacos utilizados usualmente. Na busca por novos protótipos ativos contra micobactérias é imprescindível analisar o tipo de interação farmacológica quando esses estão combinados a uma ou mais substâncias. Devido à constatação de pacientes com tuberculose apresentar falha terapêutica quando era instituído uma monoterapia antimicrobiana, é que o tratamento atual utiliza um regime de multidrogas como princípio da quimioterapia anti-TB (BHUSAL; SHIOHIRA; YAMANE, 2005). Levando isso em consideração, observamos, através dos dados obtidos pelo método checkerboard e pela cinética de morte, a existência de interações do tipo sinérgica e aditiva, frente a micobactérias sensíveis (*Mtb* H37Rv e *Msm* 607) e multidroga resistente (*Mtb* 1576). É relatado que substâncias que agem de forma direta ou indireta na parede celular micobacteriana, tendem a ter uma interação do tipo sinérgica com a rifampicina. Ocorre que através da desestabilização de componentes da parede celular, há uma maior entrada da rifampicina, assim, tende a uma maior concentração no citoplasma bacteriano e maior interação com seu alvo de ação específico (RAMÓN-GARCIÁ et al., 2016).

Através da cinética de morte podemos avaliar a farmacodinâmica de um determinado agente antimicrobiano, ou seja, observar o crescimento e morte microbiana em função do tempo e concentração da substância em análise (MÜLLER; DELA PEÑA; DERENDORF, 2004). Dessa forma, observamos o efeito bactericida do composto o-12 e efeito bacteriostático dos compostos c-2 e d-15. Contudo, ao combinar a rifampicina ao tratamento, foi possível observar uma interação sinérgica para os três compostos, garantindo um efeito bactericida prolongado. Essa característica bactericida e sinérgica com rifampicina também foi observada para o fármaco SQ-109 (PROTOPOPOVA et al., 2005).

Embora não seja considerada crítica para a progressão do composto, a atividade intracelular é altamente desejável para novos inibidores micobacterianos. Esse dado demonstra a capacidade do composto atravessar a célula eucariótica e inibir a proliferação de micobactérias internalizadas, característica importante sobretudo para a forma clínica de TB latente. Essa capacidade é um preditivo para que um composto tenha atividade em modelos de eficácia *in vivo* de infecção por TB, onde a maioria das bactérias é encontrada dentro de macrófagos (BALLELL et al., 2013). Aqui, avaliou-se o efeito do composto o-12 em macrófago infectado por *M. smegmatis* e observamos que o mesmo apresentou atividade intracelular numa concentração de 32 µM, ou seja, duas vezes maior que o valor da CIM. Ao realizar a razão entre a CIM extracelular/intracelular, foi obtido um valor menor que 1 (SORRENTINO et al., 2016) e, dessa forma, indicando uma maior atividade extracelular do composto o-12. Este comportamento pode ser observado devido a uma baixa permeabilidade da membrana celular para o composto ou por ativação de bombas de efluxo bacteriana como resposta ao meio intracelular (ADAMS et al., 2011).

Paralelo aos ensaios *in vitro*, ensaios *in silico* com metodologias robustas são realizados visando diminuição de custos e otimização do tempo na triagem e estudo da relação entre alvos moleculares e inibidores (CHETTY et al., 2017). Ao constatarmos a presença de atividade desses inibidores, mesmo em isolado de *Mtb* resistente a múltiplas drogas, foi hipotetizado que tais compostos apresentariam um novo alvo de ação. E, devido à semelhança estrutural dos compostos estudados com o etambutol e SQ-109, foi analisado através de docking molecular duas proteínas relacionadas por serem inibidas por esses fármacos. Inicialmente, buscou-se avaliar

possível interação dos compostos com a enzima embC; contudo, não houve resolução de ancoragem (dados não mostrados).

Todavia, o estudo foi direcionado para a proteína mmpL3, a qual vem sendo explorada como um alvo terapêutico por ser considerada essencial à replicação e viabilidade das células micobacterianas (GRZEGORZEWICZ et al., 2012). Especificamente, a mmpL3 participa da translocação de ácidos micólicos, produzidos no citoplasma micobacteriano, para ser utilizado na formação do envelope micobacteriano, tornando-o mais hidrofóbico, espesso, e impermeável a diversos antibióticos. O primeiro dado estrutural foi elucidado recentemente por Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2019). Após análise da interação *in silico* dos derivados aminoalcanóis e diaminas com a proteína transmembranar mmpL3, obtivemos pontuações de acoplamento molecular semelhantes ao SQ-109. Observamos também uma boa correlação de pontuação teórica com a atividade biológica, principalmente para os compostos c2, d-15 e o-12.

Ao analisar possíveis alterações na estrutura do *M. tuberculosis* após tratamento com o composto o-12, observamos por microscopia eletrônica de transmissão a presença de achados como a descontinuidade da integridade parede celular micobacteriana. Tal efeito provoca, conseqüentemente, a perda da viabilidade celular, uma vez que o envelope micobacteriano é essencial para sua sobrevivência. O envelope age, assim, como barreira contra a entrada de antibióticos e modula a resposta imune do hospedeiro (BRIKEN et al., 2004; JARLIER; NIKAIDO, 1994).

Observamos ainda, através da microscopia eletrônica, a presença de inclusões lipídicas nas células micobacterianas. Esse achado também foi relatado no estudo de Vijay e colaboradores (2018), no qual cultura líquida de isolados clínicos de Mtb e da cepa H37Rv expostas à mesilato de deferoxamina (utilizado como quelante de ferro), apresentavam um aumento no acúmulo de inclusões lipídicas. A presença aumentada dessas inclusões está relacionada a uma resposta à presença de estresse oxidativo, provocado por um agente externo, no qual ocorre um aumento do acúmulo de lipídios como mecanismo de adaptação celular bacteriana para início e sobrevivência de uma fase de latência do organismo (BARISCH; SOLDATI, 2017). Apesar desses dados serem indícios de um amplo mecanismo de ação dos análogos da diidroesfingosina em micobactérias, novos estudos moleculares serão necessários para confirmar essa hipótese.

8 CONCLUSÃO

Nesse estudo, através de diversos ensaios fenotípicos baseados na utilização de célula inteira do *Mycobacterium sp.* foram identificados potentes inibidores micobacterianos. Essas substâncias análogas à diidroesfingosina e ao etambutol (c-2, d-15 e o-12) apresentaram propriedades necessárias ao desenvolvimento de drogas anti-tuberculose como:

- a) presença de atividade inibitória em cepa multidroga resistente e, portanto, a ausência de resistência cruzada;
- b) capacidade de agir de forma sinérgica e aditiva com fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento da tuberculose;
- c) capacidade de reduzir a carga bacteriana em macrófagos infectados, indicando um efeito bactericida intracelular;
- d) poder de acoplamento a uma proteína essencial (mmpL3) à manutenção da parede micobacteriana, levando a um possível bloqueio de sua função (abordagem *in silico*);
- e) capacidade do composto o-12 em alterar a integridade da parede celular do *M. tuberculosis* (abordagem *in vitro*).

Diante do exposto, pode-se concluir que os derivados relacionados à diidroesfingosina e etambutol - com destaque para o composto o-12, apresentam propriedades farmacológicas apropriadas para dar continuidade ao processo de otimização e desenvolvimento de um composto protótipo candidato para o tratamento da tuberculose sensível e multidroga resistente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Kristin N.; TAKAKI, Kevin; CONNOLLY, Lynn E.; WIEDENHOFT, Heather; WINGLEE, Kathryn; HUMBERT, Olivier; EDELSTEIN, Paul H.; COSMA, Christine L.; RAMAKRISHNAN, Lalita. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. **Cell**, [S. l.], v. 145, n. 1, p. 39–53, 2011. ISSN: 00928674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.022.
- AHMAD, Suhail; MOKADDAS, Eiman. Current status and future trends in the diagnosis and treatment of drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. **Journal of Infection and Public Health**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 75–91, 2014. ISSN: 18760341. DOI: 10.1016/j.jiph.2013.09.001.
- AHMAD, Zahoor; MAKAYA, Nusrat Habib; GROSSET, Jacques. Chapter 1: History of Drug Discovery: Early Evaluation Studies and Lessons Learnt from Them. *In: **Prog Respir Res***. [s.l: s.n.]. v. 40p. 2–9. ISSN: 14222140. ISBN: 9783805596275. DOI: 10.1159/000324894.
- AKBAR VELAYATI, Ali; FARNIA, Parissa. Morphological Characterization of Mycobacterium tuberculosis. *In: CARDONA, Dr. Pere-Joan (org.). **Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli***. InTech ed. [s.l: s.n.]. p. 149–165. DOI: 10.5772/29644.
- ALCAIDE, Fernando; ESTEBAN, Jaime; GONZÁLEZ-MARTIN, Julià; PALACIOS, Juan-José. Methods for determining the antimicrobial susceptibility of mycobacteria. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [S. l.], v. 35, n. 8, p. 529–535, 2017. ISSN: 0213005X. DOI: 10.1016/j.eimc.2016.04.008.
- ALDERWICK, Luke J.; LLOYD, Georgina S.; LLOYD, Adrian J.; LOVERING, Andrew L.; EGGELING, Lothar; BESRA, Gurdyal S. Biochemical characterization of the Mycobacterium tuberculosis phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthetase. **Glycobiology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 410–425, 2011. ISSN: 09596658. ISBN: 1460-2423 (Electronic)r0959-6658 (Linking). DOI: 10.1093/glycob/cwq173.
- ANES, Elsa; KÜHNEL, Mark Philipp; BOS, Evelyne; MONIZ-PEREIRA, Jose; HABERMANN, Anja; GRIFFITHS, Gareth. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. **Nature cell biology**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 793–802, 2003. ISSN: 1465-7392. ISBN: 1465-7392. DOI: 10.1038/ncb1036.
- ANGALA, Shiva Kumar; BELARDINELLI, Juan Manuel; HUC-CLAUSTRE, Emilie; WHEAT, William H.; JACKSON, Mary. **The cell envelope glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis**. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** NIH Public Access, 2014. ISSN: 15497798. ISBN: 1549-7798 (Electronic)r1040-9238 (Linking). DOI: 10.3109/10409238.2014.925420.
- BALLELL, Lluís et al. Fueling Open-Source Drug Discovery: 177 Small-Molecule Leads against Tuberculosis. **ChemMedChem**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 313–321, 2013. ISSN: 18607179. DOI: 10.1002/cmdc.201200428.

BARISCH, Caroline; SOLDATI, Thierry. Breaking fat! How mycobacteria and other intracellular pathogens manipulate host lipid droplets. **Biochimie**, [S. l.], v. 141, p. 54–61, 2017. ISSN: 03009084. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.06.001.

BHAMIDI, Suresh; SCHERMAN, Michael S.; RITHNER, Christopher D.; PRENNI, Jessica E.; CHATTERJEE, Delphi; KHOO, Kay-Hooi; MCNEIL, Michael R. The Identification and Location of Succinyl Residues and the Characterization of the Interior Arabinan Region Allow for a Model of the Complete Primary Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolyl Arabinogalactan. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 19, p. 12992–13000, 2008. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M800222200.

BHATT, Apoorva et al. Deletion of kasB in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 104, n. 12, p. 5157–62, 2007. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0608654104.

BHUSAL, Y.; SHIOHIRA, C. M.; YAMANE, N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S. l.], v. 26, p. 292–297, 2005. ISSN: 09248579. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.05.005.

BLECK, C. K. E.; MERZ, A.; GUTIERREZ, M. G.; WALTHER, P.; DUBOCHET, J.; ZUBER, B.; GRIFFITHS, G. Comparison of different methods for thin section em analysis of *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Microscopy**, [S. l.], v. 237, n. June 2009, p. 23–38, 2010. ISSN: 00222720. ISBN: 1365-2818 (Electronic)r0022-2720 (Linking). DOI: 10.1111/j.1365-2818.2009.03299.x.

BRASIL. Tuberculose | 2021. **Boletim Epidemiológico**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 44, 2021. BRENNAN, Patrick J.; NIKAIKO, Hiroshi. The Envelope of Mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 29–63, 1995. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.

BRIKEN, Volker; PORCELLI, Steven A.; BESRA, Gurdyal S.; KREMER, Laurent. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 391–403, 2004. ISSN: 0950382X. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04183.x.

BRINKMANN, Volker; BILLICH, Andreas; BAUMRUKER, Thomas; HEINING, Peter; SCHMOUDER, Robert; FRANCIS, Gordon; ARADHYE, Shreeram; BURTIN, Pascale. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 883–897, 2010. ISSN: 1474-1776. DOI: 10.1038/nrd3248.

BROWN-ELLIOTT, Barbara A.; PHILLEY, Julie V. Rapidly Growing Mycobacteria. *In: Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections, Seventh Edition*. [s.l.] : American Society of Microbiology, 2017. v. 5p. 703–723. ISSN: 2165-0497. DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016.

CALEFFI-FERRACIOLI, Katiany R.; MALTEMPE, Flaviane G.; SIQUEIRA, Vera Lúcia D.; CARDOSO, Rosilene F. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, [S. l.], v. 93, n. 6, p. 660–3, 2013. ISSN: 1873-281X. DOI: 10.1016/j.tube.2013.09.001.

CHETTY, Sarentha; RAMESH, Muthusamy; SINGH-PILLAY, Ashona; SOLIMAN, Mahmoud E. S. **Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** Elsevier Ltd, 2017. ISSN: 14643405. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.11.084.

CHOLLET, Aurélien et al. Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach. **Journal of Structural Biology**, [S. l.], v. 190, n. 3, p. 328–337, 2015. ISSN: 10958657. DOI: 10.1016/j.jsb.2015.04.008.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testes for Bacteria That Grow Aerobically**. 11. ed., [s.l: s.n.]. ISBN: 1-56238-837-1.

CLSI. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. [s.l: s.n.]. ISBN: 156238838X.

COHEN, Jon. **Approval of novel TB drug celebrated - With restraint. Science** American Association for the Advancement of Science, 2013. ISSN: 10959203. DOI: 10.1126/science.339.6116.130.

Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2014.

COOPER, Christopher B. Development of mycobacterium tuberculosis whole cell screening hits as potential antituberculosis agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 20, p. 7755–7760, 2013. ISSN: 15204804. DOI: 10.1021/jm400381v.

DAFFÉ, Mamadou. The cell envelope of tubercle bacilli. **Tuberculosis**, [S. l.], p. 2–5, 2015. ISSN: 14729792. DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.024.

DANGERFIELD, Emma; WIN-MASON, Anna; TIMMER, Mattie SM; STOCKER, Bridget L. Tuberculosis: Bugs Versus Drugs Part 1. **Chemistry in Australia**, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 17–21, 2010.

DANIELS, M.; HILL, A. B. Chemotherapy of pulmonary tuberculosis in young adults; an analysis of the combined results of three Medical Research Council trials. **British medical journal**, [S. l.], v. 1, n. 4769, p. 1162–8, 1952. ISSN: 0007-1447.

DE CAMPOS BUZZI, Fátima; FRACASSO, Mauricio; CECHINEL FILHO, Valdir; ESCARCENA, Ricardo; DEL OLMO, Esther; SAN FELICIANO, Arturo. New antinociceptive agents related to dihydrosphingosine. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 62, n. 5, p. 849–857, 2010. ISSN: 17341140. ISBN: 1734-1140. DOI:

10.1016/S1734-1140(10)70344-3.

DEL OLMO, Esther; MOLINA-SALINAS, Gloria María; ESCARCENA, Ricardo; ALVES, Mario; LÓPEZ-PÉREZ, José L.; HERNANDEZ-PANDO, Rogelio; SAID-FERNÁNDEZ, Salvador; FELICIANO, Arturo San. Simple dihydrosphingosine analogues with potent activity against MDR-Mycobacterium tuberculosis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 19, n. 19, p. 5764–5768, 2009 a. ISSN: 0960894X. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.07.147.

DEL OLMO, Esther; MOLINA-SALINAS, Gloria María; ESCARCENA, Ricardo; ALVES, Mario; LÓPEZ-PÉREZ, José L.; HERNANDEZ-PANDO, Rogelio; SAID-FERNÁNDEZ, Salvador; FELICIANO, Arturo San. Simple dihydrosphingosine analogues with potent activity against MDR-Mycobacterium tuberculosis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 19, n. 19, p. 5764–5768, 2009 b. ISSN: 0960894X. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.07.147.

DIACON, Andreas H.; DONALD, Peter R. The early bactericidal activity of antituberculosis drugs. [S. l.], v. 12, n. 2, p. 223–237, 2014. DOI: 10.1586/14787210.2014.870884.

DICKINSON, J. M.; MITCHISON, D. A. Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampin in the chemotherapy of tuberculosis. **The American review of respiratory disease**, [S. l.], v. 123, n. 4 Pt 1, p. 367–71, 1981. ISSN: 0003-0805.

DONALD, P. R.; SIRGEL, F. A.; VENTER, A.; PARKIN, D. P.; SEIFART, H. I.; VAN DE WAL, B. W.; WERELY, C.; VAN HELDEN, P. D.; MARITZ, J. S. The influence of human N-acetyltransferase genotype on the early bactericidal activity of isoniazid. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, [S. l.], v. 39, n. 10, p. 1425–30, 2004. ISSN: 1537-6591. DOI: 10.1086/424999.

DONALD, Peter R.; MCILLERON, Helen. Clinical management of tuberculosis. In: HODGSON, Sue (org.). **Tuberculosis**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier, 2009. p. 608–617. ISBN: 9781416039884. DOI: 10.1016/B978-1-4160-3988-4.00059-7.

DOS SANTOS, Ana Cristina Doria; MARINHO, Victor Hugo De Souza; SILVA, Pedro Henrique De Aviz; MACCHI, Barbarella De Matos; ARRUDA, Mara Silvia Pinheiro; SILVA, Edilene Oliveira Da; DO NASCIMENTO, José Luiz Martins; SENA, Chubert Bernardo Castro De. Microenvironment of Mycobacterium smegmatis Culture to Induce Cholesterol Consumption Does Cell Wall Remodeling and Enables the Formation of Granuloma-Like Structures. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2019, n. Mm, 2019. ISSN: 23146141. DOI: 10.1155/2019/1871239.

DOSTER, B.; MURRAY, F. J.; NEWMAN, R.; WOOLPERT, S. F. Ethambutol in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. U.S. Public Health Service tuberculosis therapy trials. **The American review of respiratory disease**, [S. l.], v. 107, n. 2, p. 177–90, 1973. ISSN: 0003-0805.

DUARTE, R.; CARVALHO, A.; FERREIRA, D.; SALEIRO, S.; LIMA, R.; MOTA, M.;

RAYMUNDO, E.; VILLAR, M.; CORREIA, A. Tuberculosis treatment and management of some problems related to the medication. **Revista portuguesa de pneumologia**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 559–72, 2010. ISSN: 2172-6825.

DUCATI, Rodrigo Gay; RUFFINO-NETTO, Antonio; BASSO, Luiz Augusto; SANTOS, Diógenes Santiago. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 101, n. 7, p. 697–714, 2006. ISSN: 0074-0276.

ESCUYER, V. E. et al. The role of the embA and embB gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of Mycobacterium smegmatis arabinogalactan. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 276, n. 52, p. 48854–62, 2001. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M102272200.

FALZON, D. et al. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. **The European respiratory journal**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 516–28, 2011. ISSN: 1399-3003. DOI: 10.1183/09031936.00073611.

FARNIA, Parissa et al. Growth and cell-division in extensive (XDR) and extremely drug resistant (XXDR) tuberculosis strains: transmission and atomic force observation. **International journal of clinical and experimental medicine**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 308–14, 2010. ISSN: 1940-5901.

FENG, Xinxin et al. Antiinfectives targeting enzymes and the proton motive force. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 112, n. 51, p. E7073–E7082, 2015. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1521988112.

FOX, W.; ELLARD, G. A.; MITCHISON, D. A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, [S. l.], v. 3, n. 10 Suppl 2, p. S231-79, 1999. ISSN: 1027-3719.

FOX, WALLACE; SUTHERLAND, IAN; DANIELS, MARC. A five-year assessment of patients in a controlled trial of streptomycin in pulmonary tuberculosis; report to the Tuberculosis Chemotherapy Trials Committee of the Medical Research Council. **QJM**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 347–366, 1954.

FRAUNFELDER, Frederick W.; SADUN, Alfredo A.; WOOD, Terry. Update on ethambutol optic neuropathy. **Expert opinion on drug safety**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 615–8, 2006. ISSN: 1744-764X. DOI: 10.1517/14740338.5.5.615.

GANGADHARAM, Pattisapu R. J.; JENKINS, P. A. (P. Anthony). **Mycobacteria: I, Basic aspects**. [s.l.] : Springer, 2012. ISBN: 1461377439.

GARG, Sanjay K. et al. Sphingosine 1 – Phosphate Induces Antimicrobial Activity Both In Vitro and In Vivo. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 189, p. 2129–38, 2004.

GARIMA, Kushal; PATHAK, Rakesh; TANDON, Rashmi; RATHOR, Nisha; SINHA, Rajesh; BOSE, Mridula; VARMA-BASIL, Mandira. Differential expression of efflux

pump genes of *Mycobacterium tuberculosis* in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. **Tuberculosis**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 1–7, 2015. ISSN: 14729792. DOI: 10.1016/j.tube.2015.01.005.

GÓMARA, Marta; RAMÓN-GARCÍA, Santiago. The FICI paradigm: Correcting flaws in antimicrobial in vitro synergy screens at their inception. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 163, n. December 2018, p. 299–307, 2019. ISSN: 18732968. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.03.001.

GRANGE, John; ZUMLA, Alimuddin. Tuberculosis. *In*: COOK, Gordon C.; ZUMLA, Alimuddin (org.). **Manson's Tropical Diseases**. [s.l.]: Elsevier Health Sciences, 2008. p. 1800. ISBN: 070204332X.

GRZEGORZEWICZ, Anna E. et al. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. **Nature Chemical Biology**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 334–341, 2012. ISSN: 15524469. DOI: 10.1038/nchembio.794.

GRZEGORZEWICZ, Anna E.; JACKSON, Mary. Subfractionation and analysis of the cell envelope (lipo) polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 966, p. 309–324, 2013. ISSN: 10643745. ISBN: 9781627032445. DOI: 10.1007/978-1-62703-245-2_19.

GRZELAK, Edyta M. et al. **Strategies in anti-*Mycobacterium tuberculosis* drug discovery based on phenotypic screening**. **Journal of Antibiotics** 2019. ISSN: 18811469. DOI: 10.1038/s41429-019-0205-9.

GRZYBOWSKI, Andrzej; SAK, Jarosław; PAWLIKOWSKI, Jakub; IWANOWICZ-PALUS, Grażyna. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912)--the 100th anniversary of the death of the discoverer of *Mycobacterium leprae*. **Clinics in dermatology**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 653–55, 2013. ISSN: 1879-1131.

HETT, Erik C.; RUBIN, Eric J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 126–56, table of contents, 2008. ISSN: 1098-5557. DOI: 10.1128/MMBR.00028-07.

HONG KONG CHEST SERVICE/BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Controlled trial of 6-month and 8-month regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis: The results up to 24 months** **Tubercle**. [s.l.: s.n.]. ISSN: 00413879. DOI: 10.1016/0041-3879(79)90001-1.

HUF, Gisele; KRITSKI, Afrânio. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 237–245, 2012. ISSN: 1806-3713. DOI: 10.1590/S1806-37132012000200014.

INOYAMA, Daigo et al. Novel pyrimidines as antitubercular agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 62, n. 3, 2018. ISSN: 10986596. DOI: 10.1128/AAC.02063-17.

JAGANNATH, Chinnaswamy; REDDY, Venkata M.; GANGADHARAM, Pattisapu R. J. Enhancement of drug susceptibility of multi-drug resistant strains of mycobacterium tuberculosis by ethambutol and dimethyl sulphoxide. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 381–390, 1995. ISSN: 03057453. DOI: 10.1093/jac/35.3.381.

JAMES, B. W.; WILLIAMS, A; MARSH, P. D. The physiology and pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis grown under controlled conditions in a defined medium. **Journal of applied microbiology**, [S. l.], v. 88, p. 669–677, 2000. ISSN: 1364-5072. ISBN: 1364-5072 (Print). DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01020.x.

JANKUTE, Monika; COX, Jonathan A. G.; HARRISON, James; BESRA, Gurdyal S. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 405–423, 2015. ISSN: 0066-4227. ISBN: 1545-3251 (Electronic)0066-4227 (Linking). DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104121.

JANKUTE, Monika; GROVER, Shipra; RANA, Amrita K.; BESRA, Gurdyal S. Arabinogalactan and lipoarabinomannan biosynthesis: structure, biogenesis and their potential as drug targets. **Future Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 129–147, 2012. ISSN: 1746-0913. DOI: 10.2217/fmb.11.123.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in Mycobacterium chelonae. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 172, n. 3, p. 1418–23, 1990. ISSN: 0021-9193.

JARLIER, Vincent; NIKAIDO, Hiroshi. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 123, n. 1–2, p. 11–18, 1994. ISSN: 03781097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07194.x.

KIESER, Karen J.; RUBIN, Eric J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. **Nature reviews. Microbiology**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 550–562, 2014. ISSN: 1740-1534. ISBN: 1740-1534. DOI: 10.1038/nrmicro3299.

KOCH, R. A Further Communication on a Remedy for Tuberculosis. **British medical journal**, [S. l.], v. 1, n. 1568, p. 125–7, 1891. ISSN: 0007-1447.

KOUL, Anil; ARNOULT, Eric; LOUNIS, Nacer; GUILLEMONT, Jerome; ANDRIES, Koen. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, [S. l.], v. 469, n. 7331, p. 483–490, 2011. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature09657.

LEE, Woo J.; KANG, Seong M.; SUNG, Heungsup; WON, Chong H.; CHANG, Sung E.; LEE, Mi W.; KIM, Mi N.; CHOI, Jee H.; MOON, Kee C. Non-tuberculous mycobacterial infections of the skin: A retrospective study of 29 cases. **The Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 37, n. 11, p. 965–972, 2010. ISSN: 03852407. DOI: 10.1111/j.1346-8138.2010.00960.x.

LIU, J. Cell wall: physical structure and permeability. *In*: RATLEDGE, C.; DALE, J. W. (org.). **Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence**. [s.l.] : Chapman & Hal, 1999. p. 1–44.

LORIAN, Victor (ORG.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Lippincott ed., [s.l.] : Lippincott Williams & Wilkins, 2005. ISBN: 0781749832.

LUCAS, R.; UBEDA, A.; PAYÁ, M.; ALVES, M.; DEL OLMO, E.; LÓPEZ, J. L.; SAN FELICIANO, A. Synthesis and enzyme inhibitory activities of a series of lipidic diamine and aminoalcohol derivatives on cytosolic and secretory phospholipases A2. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 285–8, 2000. ISSN: 0960-894X.

LYNCH, Kevin R.; MACDONALD, Timothy L. Sphingosine 1-phosphate chemical biology. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1781, n. 9, p. 508–12, 2008. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2008.06.006.

MANDALA, S. et al. Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists. **Science**, [S. l.], v. 296, n. 5566, p. 346–349, 2002. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.1070238.

MCQUISTON, Travis J.; HALLER, Charles; POETA, Maurizio Del. Sphingolipids as targets for microbial infections. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 671–680, 2006. DOI: 1389-5575/06.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Streptomycin Treatment of Pulmonary Tuberculosis: A Medical Research Council Investigation**BMJ. [s.l: s.n.]. ISSN: 0959-8138. DOI: 10.1136/bmj.2.4582.769.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Various combinations of isoniazid with streptomycin or with P.A.S. in the treatment of pulmonary tuberculosis; seventh report to the Medical Research Council by their Tuberculosis Chemotherapy Trials Committee. **British medical journal**, [S. l.], v. 1, n. 4911, p. 435–45, 1955. ISSN: 0007-1447. DOI: 10.1136/bmj.1.4911.435.

MIKUSOVÁ, K.; SLAYDEN, R. A.; BESRA, G. S.; BRENNAN, P. J. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S. l.], v. 39, n. 11, p. 2484–9, 1995. ISSN: 0066-4804.

MITCHISON, D. a. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 796–806, 2000. ISSN: 10273719. ISBN: 1027-3719 (Print)n1027-3719 (Linking).

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, [S. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. ISSN: 0022-1759.

MÜLLER, Markus; DELA PEÑA, Amparo; DERENDORF, Hartmut. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Distribution in Tissue. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 1441–1453, 2004. ISSN: 00664804. ISBN: 0066-4804 (Print). DOI: 10.1128/AAC.48.5.1441-1453.2004.

MUSSER, J. M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic

insights. **Clinical microbiology reviews**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 496–514, 1995. ISSN: 0893-8512.

NGUYEN, Liem; THOMPSON, Charles J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 304–312, 2006. ISSN: 0966842X. ISBN: 0966-842X (Print)r0966-842X (Linking). DOI: 10.1016/j.tim.2006.05.005.

OLMO, Esther Del et al. Efficacious In Vitro and In Vivo Effects of Dihydrospingosine–Ethambutol Analogues Against Susceptible and Multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Archives of Medical Research**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 262–270, 2016. ISSN: 01884409. DOI: 10.1016/j.arcmed.2016.07.004.

PALOMINO, Juan-carlos; MARTIN, Anandi; CAMACHO, Mirtha; GUERRA, Humberto; SWINGS, Jean; PORTAELS, Françoise. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobail Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 46, p. 2720–2722, 2002. DOI: 10.1128/AAC.46.8.2720.

PAVAN, Fernando R. et al. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 10, p. 5099–5107, 2011. ISSN: 02235234. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.08.023.

PROTOPOPOVA, Marina; HANRAHAN, Colleen; NIKONENKO, Boris; SAMALA, Rowena; CHEN, Ping; GEARHART, Jackie; EINCK, Leo; NACY, Carol A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 968–974, 2005 a. ISSN: 03057453. DOI: 10.1093/jac/dki319.

PROTOPOPOVA, Marina; HANRAHAN, Colleen; NIKONENKO, Boris; SAMALA, Rowena; CHEN, Ping; GEARHART, Jackie; EINCK, Leo; NACY, Carol A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 968–74, 2005 b. ISSN: 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dki319.

PRUETT, Sarah T.; BUSHNEV, Anatoliy; HAGEDORN, Kerri; ADIGA, Madhura; HAYNES, Christopher A.; SULLARDS, M. Cameron; LIOTTA, Dennis C.; MERRILL, Alfred H. Sphingolipids. Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 49, n. 8, p. 1621–1639, 2008. ISSN: 0022-2275. DOI: 10.1194/jlr.R800012-JLR200.

RAMÓN-GARCIÁ, Santiago et al. Repurposing clinically approved cephalosporins for tuberculosis therapy. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, 2016. ISSN: 20452322. DOI: 10.1038/srep34293.

RAWAT, Richa; WHITTY, Adrian; TONGE, Peter J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase:

adduct affinity and drug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 100, n. 24, p. 13881–6, 2003. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.2235848100.

RAYMOND, Jon B.; MAHAPATRA, Sebabrata; CRICK, Dean C.; PAVELKA, Martin S. Identification of the namH gene, encoding the hydroxylase responsible for the N-glycosylation of the mycobacterial peptidoglycan. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 1, p. 326–33, 2005. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M411006200.

RIVA, S.; SILVESTRI, L. G. Rifamycins: a general view. **Annual review of microbiology**, [S. l.], v. 26, p. 199–224, 1972. ISSN: 0066-4227. DOI: 10.1146/annurev.mi.26.100172.001215.

RUNYON, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **The Medical clinics of North America**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 273–90, 1959. ISSN: 0025-7125.

SAFI, Hassan; FLEISCHMANN, Robert D.; PETERSON, Scott N.; JONES, Marcus B.; JARRAHI, Behnam; ALLAND, David. Allelic exchange and mutant selection demonstrate that common clinical embCAB gene mutations only modestly increase resistance to ethambutol in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 103–108, 2010. ISSN: 00664804. DOI: 10.1128/AAC.01288-09.

SANCHOTENE, Karine O.; VON GROLL, Andrea; RAMOS, Daniela; SCHOLANTE, Ana B.; HONSCHA, Gunther; VALENÇA, Mariana; SCAINI, Carlos J.; DA SILVA, Pedro E. A. Comparative evaluation of the Nitrate Reductase Assay and the Resazurin Microtitre Assay for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against first line anti-tuberculosis drugs. **Brazilian journal of microbiology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 16–20, 2008. ISSN: 1517-8382. DOI: 10.1590/S1517-83822008000100004.

SCHATZ, A.; BUGLE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.* . **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 66–69, 1944. ISSN: 1535-3702. DOI: 10.3181/00379727-55-14461.

SCHITO, Marco; HANNA, Debra; ZUMLA, Alimuddin. Tuberculosis eradication versus control. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, [S. l.], v. 56, p. 10–13, 2017. ISSN: 1878-3511. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.11.007.

SCHMITZ, Gerd; GRANDL, Margot. Update on lipid membrane microdomains. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 106–112, 2008. ISSN: 1363-1950. DOI: 10.1097/MCO.0b013e3282f44c2c.

SCHRÖDINGER, LLC. **The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.8.** [s.l: s.n.].

SHARMA, S.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; DUDHE, R. A review on various

heterocyclic moieties and their antitubercular activity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 244–251, 2011. ISSN: 07533322. DOI: 10.1016/j.biopha.2011.04.005.

SHI, Libin; ZHOU, Roukun; LIU, Zhentong; LOWARY, Todd L.; SEEBERGER, Peter H.; STOCKER, Bridget L.; CRICK, Dean C.; KHOO, Kay-Hooi; CHATTERJEE, Delphi. Transfer of the first arabinofuranose residue to galactan is essential for *Mycobacterium smegmatis* viability. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 190, n. 15, p. 5248–55, 2008. ISSN: 1098-5530. DOI: 10.1128/JB.00028-08.

SHI, Wanliang; ZHANG, Xuelian; JIANG, Xin; YUAN, Haiming; LEE, Jong Seok; BARRY, Clifton E.; WANG, Honghai; ZHANG, Wenhong; ZHANG, Ying. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 333, n. 6049, p. 1630–2, 2011. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1208813.

SHINNICK, T. M.; GOOD, R. C. Mycobacterial taxonomy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 884–901, 1994. ISSN: 09349723. ISBN: 0934-9723 (Print)n0934-9723 (Linking). DOI: 10.1007/BF02111489.

SHLEEVA, Margarita O.; KUDYKINA, Yulia K.; VOSTROKNUTOVA, Galina N.; SUZINA, Natalia E.; MULYUKIN, Andrey L.; KAPRELYANTS, Arseny S. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification. **Tuberculosis**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 146–154, 2011. ISSN: 14729792. DOI: 10.1016/j.tube.2010.12.006.

SILVA, Denise et al. Novos fármacos e fármacos repropostos para o tratamento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente. [S. l.], v. 44, n. 2, p. 153–160, 2018. ISSN: 1806-3713. ISBN: 0000000302302.

SINGAPORE TUBERCULOSIS SERVICE/BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Long-term follow-up of a clinical trial of six-month and four-month regimens of chemotherapy in the treatment of pulmonary tuberculosis. The American review of respiratory disease**. [s.l.: s.n.]. ISSN: 0003-0805.

SMITH, Issar. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical microbiology reviews**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 463–96, 2003. ISSN: 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.16.3.463-496.2003.

SORRENTINO, Flavia; DEL RIO, Ruben Gonzalez; ZHENG, Xingji; MATILLA, Jesus Presa; GOMEZ, Pedro Torres; HOYOS, Maria Martinez; HERRAN, Maria Esther Perez; LOSANA, Alfonso Mendoza; AV-GAY, Yossef. Development of an intracellular screen for new compounds able to inhibit *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 640–645, 2016. ISSN: 10986596. DOI: 10.1128/AAC.01920-15.

TAKAYAMA, K.; KILBURN, J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S. l.], v. 33, n. 9, p. 1493–9, 1989. ISSN: 0066-4804.

TAKAYAMA, Kuni; WANG, Cindy; BESRA, Gurdyal S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in Mycobacterium tuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 81–101, 2005. ISSN: 0893-8512. ISBN: 0893-8512 (Print)r0893-8512 (Linking). DOI: 10.1128/CMR.18.1.81-101.2005.

TANEJA, Neetu Kumra; TYAGI, Jaya Sivaswami. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium smegmatis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 288–293, 2007. ISSN: 1460-2091. DOI: 10.1093/jac/dkm207.

TANG, Patrick; JOHNSTON, James. Treatment of Latent Tuberculosis Infection. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 371–379, 2017. ISSN: 1534-6250. DOI: 10.1007/s40506-017-0135-7.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; LOWRIE, D.; COLE, S.; COLSTON, M. J.; MATTER, L.; SCHOPFER, K.; BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 341, n. 8846, p. 647–50, 1993. ISSN: 0140-6736.

TIEMERSMA, Edine W.; VAN DER WERF, Marieke J.; BORGDORFF, Martien W.; WILLIAMS, Brian G.; NAGELKERKE, Nico J. D. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. **PloS one**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. e17601, 2011. ISSN: 1932-6203. ISBN: 10.1371/journal.pone.0017601. DOI: 10.1371/journal.pone.0017601.

TRIAS, Joaquim; BENZ, Roland. Permeability of the cell wall of Mycobacterium smegmatis. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 283–290, 1994. ISSN: 13652958. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01289.x.

UC-CACHÓN, Andrés Humberto; BORGES-ARGÁEZ, Rocío; SAID-FERNÁNDEZ, Salvador; VARGAS-VILLARREAL, Javier; GONZÁLEZ-SALAZAR, Francisco; MÉNDEZ-GONZÁLEZ, Martha; CÁCERES-FARFÁN, Mirbella; MOLINA-SALINAS, Gloria María. Naphthoquinones isolated from Diospyros anisandra exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs Mycobacterium tuberculosis strains. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 114–120, 2014. ISSN: 10945539. ISBN: 1522-9629 (Electronic)r1094-5539 (Linking). DOI: 10.1016/j.pupt.2013.08.001.

VIJAY, Srinivasan; HAI, Hoang T.; THU, Do D. A.; JOHNSON, Errin; PIELACH, Anna; PHU, Nguyen H.; THWAITES, Guy E.; THUONG, Nguyen T. T. Ultrastructural Analysis of Cell Envelope and Accumulation of Lipid Inclusions in Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates from Sputum, Oxidative Stress, and Iron Deficiency. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, 2018. ISSN: 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02681.

VILAPLANA, Cristina. A literary approach to tuberculosis: lessons learned from Anton Chekhov, Franz Kafka, and Katherine Mansfield. **International Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 56, p. 283–285, 2017. ISSN: 1201-9712. DOI: 10.1016/J.IJID.2016.12.012.

WANG, W.; JONES, C.; CIACCI-ZANELLA, J.; HOLT, T.; GILCHRIST, D. G.; DICKMAN, M. B. Fumonisin and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 93, n. 8, p. 3461–5, 1996. ISSN: 0027-8424.

WATERHOUSE, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018. ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gky427.

WHO. **Treatment of Tuberculosis: Guidelines**. Geneva: World Health Organization, 2010.

WHO. **Global tuberculosis report**. Geneva: World Health Organization, 2014. ISBN: 978 92 4 156480 9.

WHO. **Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care**. [s.l.: s.n.]. ISBN: 978-92-4-155000-0.

WHO. **Global tuberculosis report 2020**. Geneva.

WILKINSON, R. G.; SHEPHERD, R. G.; THOMAS, J. P.; BAUGHN, C. STEREOSPECIFICITY IN A NEW TYPE OF SYNTHETIC ANTITUBERCULOUS AGENT 1,2. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 83, n. 9, p. 2212–2213, 1961. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja01470a052.

WILSON, R. J.; PILLAY, D. G.; STURM, A. W. Mycobacterium tuberculosis is not an obligate aerobe. **Journal of Infection**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 197–198, 1999. ISSN: 01634453. DOI: 10.1016/S0163-4453(99)90253-0.

WOLUCKA, B. A.; MCNEIL, M. R.; DE HOFFMANN, E.; CHOJNACKI, T.; BRENNAN, P. J. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 269, n. 37, p. 23328–35, 1994. ISSN: 0021-9258.

WRIGHT, Gerard D. Back to the future: a new 'old' lead for tuberculosis. **EMBO Molecular Medicine**, [S. l.], v. 4, n. 10, p. 1029–1031, 2012. ISSN: 17574676. DOI: 10.1002/emmm.201201811.

ZHANG, Bing et al. Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. **Cell**, [S. l.], v. 176, n. 3, p. 636–648.e13, 2019. ISSN: 10974172. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.003.

ZHANG, Lu et al. Structures of cell wall arabinosyltransferases with the anti-tuberculosis drug ethambutol. **Science**, [S. l.], v. 368, n. 6496, p. 1211–1219, 2020. ISSN: 10959203. DOI: 10.1126/science.aba9102.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D.; COLE, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, [S. l.], v. 358,

p. 591–593, 1992. ISSN: 0028-0836. ISBN: 0028-0836. DOI: 10.1038/358591a0.
ZHANG, Ying; SHI, Wanliang; ZHANG, Wenhong; MITCHISON, Denis. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. **Microbiology spectrum**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. MGM2-0023–2013, 2014. ISSN: 2165-0497. DOI: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013.

ZHANG, Ying; WADE, Mary Margaret; SCORPIO, Angelo; ZHANG, Hao; SUN, Zhonghe. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 790–5, 2003. ISSN: 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dkg446.

ZHENG, Wenjing et al. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [S. l.], v. 1758, n. 12, p. 1864–1884, 2006. ISSN: 00052736. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.08.009.

ZUMLA, Alimuddin; NAHID, Payam; COLE, Stewart T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature reviews. Drug discovery**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 388–404, 2013. ISSN: 1474-1784. DOI: 10.1038/nrd4001.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

330 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 111(5): 330-334, May 2016

Effects of the encapsulation of usnic acid into liposomes and interactions with antituberculous agents against multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates

Rafaela S Ferraz-Carvalho¹, Marcela A Pereira¹, Leonardo A Linhares², Mariane CB Lira-Nogueira¹, Isabella MF Cavalcanti^{1,3}, Nereide S Santos-Magalhães¹, Lílian ML Montenegro^{2/+}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Recife, PE, Brasil

²Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia,

Laboratório de Imunoepidemiologia, Recife, PE, Brasil ³Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) has acquired resistance and consequently the antibiotic therapeutic options available against this microorganism are limited. In this scenario, the use of usnic acid (UA), a natural compound, encapsulated into liposomes is proposed as a new approach in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) therapy. Thus the aim of this study was to evaluate the effect of the encapsulation of UA into liposomes, as well as its combination with antituberculous agents such as rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) against MDR-TB clinical isolates. The in vitro antimycobacterial activity of UA-loaded liposomes (UA-Lipo) against MDR-TB was assessed by the microdilution method. The in vitro interaction of UA with antituberculous agents was carried out using checkerboard method. Minimal inhibitory concentration values were 31.25 and 0.98 µg/mL for UA and UA-Lipo, respectively. The results exhibited a synergistic interaction between RIF and UA [fractional inhibitory concentration index (FICI) = 0.31] or UA-Lipo (FICI = 0.28). Regarding INH, the combination of UA or UA-Lipo revealed no marked effect (FICI = 1.30-2.50). The UA-Lipo may be used as a dosage form to improve the antimycobacterial activity of RIF, a first-line drug for the treatment of infections caused by Mtb.

Key words: MDR-TB - antimycobacterial activity - synergism - usnic acid - liposomes

Tuberculosis (TB) is a chronic bacterial infection caused by an airborne microorganism known as *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). The treatment for susceptible Mtb isolates is based on a combination of isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (EMB) and pyrazinamide (PZA) (WHO 2013). Patients with TB infection usually require a long-term therapy and non-compliance with the full therapeutic regimen may lead to the emergence of multi- and extensively drug-resistant Mtb (MDR-TB and XDR-TB) strains (Ganihigama et al. 2015). In 2010, only 48% of MDR-TB patients worldwide were successfully treated with the currently used anti-TB drugs (WHO 2013). The therapeutic options for the treatment of MDR-TB are PZA concurrently with second-line drugs such as ethionamide, prothionamide, cycloserine, capreomycin, p-aminosalicylic acid or fluoroquinolones (Mukherjee et al. 2004). Since the second-line of antituberculous drugs exhibit more toxicity, are more expensive and less potent than the first-line agents (Kaur & Singh 2014), there is an urgent need to find new effective drugs, new forms of drug administration and combinations of antituberculous agents for the treatment of TB.

In the last few years, many new synthetic or natural agents have been tested against Mtb in order to discover compounds capable of replacing or complementing established drugs used in TB therapy (WHO 2013). Usnic acid (UA), a lichen dibenzofuran derivative, has been shown to have an interesting antimycobacterial activity (Ingólfsson et al. 1998). However, its weak potency compared with reference antimycobacterial drugs does not allow its use as an antituberculous drug (Yempala et al. 2013).

Moreover, nanotechnology has emerged as an efficient tool able to enhance drug efficacy and overcome the resistance of *Mycobacterium* against well-known antibiotics usually prescribed in clinical practice (Yempala et al. 2013). These advantages, associated with the fact that only one anti-TB drug (TMC207) has been approved by the United States Food and Drug Administration in the last four decades, indicate the feasibility of nanosystems, such as liposomes containing antimycobacterial drugs (Ganihigama et al. 2015). Liposome encapsulation has long been shown to improve the therapeutic efficacy of antimicrobial drugs (El-Ridy et al. 2007, Gaspar et al. 2008). More recently, proliposomes containing levofloxacin have been used in the form of Mtb treatment with promising results (Rojanarat et al. 2012). With regard to the combination of drugs, pulmonary TB and further drug-resistant cases almost invariably require a combination of multidrug regimens over long periods of treatment (Pham et al. 2015). Therefore, the combination of first-line drugs (e.g. RIF or INH) with UA in drug delivery systems, emerges as an approach to take advantage in TB therapy (Bapela et al. 2006, Ganihigama et al. 2015).

doi: 10.1590/0074-02760150454

Financial support: FACEPE (grant #APQ-1868-4.03/12 and PhD scholarship #IBPG-0846-2.08/10), CNPq (#476640/2012-1).

+ Corresponding author: lilian@cpqam.fiocruz.br

Received 14 December 2015

Accepted 20 March 2016

online | memorias.ioc.fiocruz.br

Although the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of UA (Marshak & Kushner 1950, Honda et al. 2010, Ramos & Silva 2010), and UA encapsulated into liposomes against Mtb is well established (Lira et al. 2009), their activity against MDR-TB, as well as their interactions with RIF and INH, has not yet been investigated. Thus, the aim of our study was to evaluate the effect of UA encapsulation into liposomes (UA-Lipo) and its combinations with RIF or INH, against MDR-TB clinical isolates.

MATERIALS AND METHODS

INH, RIF, (+)-UA, cholesterol (Chol), stearylamine (SA) and Middlebrook 7H9 medium were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Middlebrook OADC Enrichment was purchased from Becton Dickinson (New Jersey, USA). Soybean phosphatidylcholine (PC) (94% Epikuron 200[®]) was furnished by Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Germany). All solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

Preparation and characterisation of liposomes containing UA - Positively-charged liposomes containing UA-Lipo were prepared using lipids at 80 mM (soya PC, Chol and SA; 8:1:1) and UA (2 mg/mL) by the thin film method. Briefly, lipid constituents and UA were dissolved in a mixture of chloroform and methanol (3:1 v/v) under magnetic stirring. The solvents were removed under pressure (37°C, 80 rpm) and the thin film formed was hydrated with 10 mL of phosphate buffer solution (7.4 pH). The liposomal dispersion was then sonicated (Vibra Cell, BRANSON, USA) at 200 W and 40 Hz for 300 s in order to obtain small unilamellar vesicles.

The mean particle size and polydispersity index of liposomes were measured by photon autocorrelation spectroscopy using a laser particle analyser Delsa TM Nano-S (Beckman Coulter, UK). The zeta potential of the liposomes was determined by electrophoretic mobility using a ZetasizerNano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK). Analyses were performed using samples diluted with deionised water (2:1) at 25°C. Moreover, the encapsulation efficiency of UA into liposomes was determined using ultrafiltration/centrifugation by a previously validated method (Lira et al. 2009).

Antimycobacterial activity - Mycobacterium strains and growth conditions - The Mtb H37Rv ATCC 27294 strain and six MDR-TB clinical isolates were studied (MDR-TB 1412, 1619, 0729, 1411, 1409 and 1484). MDR-TB isolates were obtained from the Central Public Health Laboratory of Pernambuco (LACEN/PE, Brazil). Drug susceptibility of MDR-TB isolates to first-line drugs [EMB, streptomycin (SM), INH and RIF] was verified using standard agar methods (LACEN, PE, Brazil). Mtb strains were cultured in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% (v/v) OADC, 0.05% (v/v) Tween 80 (Sigma-Aldrich) and 0.2% (v/v) glycerol (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C for approximately 10 days.

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) - The antimycobacterial activity of the tested samples (UA and UA-Lipo) and the reference drugs,

INH and RIF, was determined in triplicate through the Microplate Alamar Blue Assay (CLSI 2011). Initially, all the 96-well microplates were filled with 100 µL of Middlebrook 7H9 broth. Serial two-fold dilutions of drugs were made by transferring 100 µL from the first to the last well. INH solution was prepared in sterile distilled water and diluted in 7H9 broth to a concentration from 16 to 0.25 µg/mL. RIF and UA were dissolved in 0.5% methanol (8-0.125 µg/mL and 125-1.95 µg/mL, respectively) and UA-Lipo was dissolved in Middlebrook 7H9 broth (500-0.122 µg/mL). Finally, the concentrations of H37Rv ATCC 27294 and MDR-TB clinical isolates were adjusted to a density corresponding to 1.0 McFarland turbidity standards, followed by dilution (1:20 v/v) in 7H9 broth. Each well was inoculated with 100 µL of this bacterial suspension. Plates were incubated at 37 ± 1°C for approximately 10 days. Next, 30 µL of freshly prepared resazurin (0.01%) was added to each well and incubated for 24 h. Growth of the microorganisms after reincubation at 37 ± 1°C for 24 h was verified by visual determination of a colour change from blue to pink. The MIC is defined as the lowest drug concentration that prevents the colour change. The positive and negative control wells were consisted of Middlebrook 7H9 broth with bacterial suspension, and Middlebrook 7H9 broth plus the tested drugs, respectively. Methanol (0.5%) and unloaded liposomes (40-0.625 mM total lipid concentration) were used to evaluate any possible effects of solvents and liposomal constituents on bacterial growth. All the experiments were performed in triplicate.

Checkerboard method - The *in vitro* interactions between RIF or INH and UA or UA-Lipo were evaluated by the checkerboard bidimensional method (Agertt et al. 2013). Initially, the 96-well microplates were seeded by dispersing 100 µL of Middlebrook 7H9 broth into each well. Next, it was dispensed in the X-axis of the 96-well microdilution plates the serially diluted standards (RIF or INH) and in the Y-axis the testing drugs (UA or UA-Lipo) to obtain a final concentration equal to the MIC or dilutions lower than the MIC of the respective drugs. Finally, the bacterial concentration was adjusted to a density corresponding to 1.0 McFarland turbidity standards, followed by dilution (1:20 v/v) in the 7H9 broth. Each well was inoculated with 100 µL of this bacterial suspension. The plates were then incubated at 37 ± 1°C for approximately 10 days. All the experiments were performed in triplicate.

$$\sum FICI = FIC_A + FIC_B = MIC_{AB} / MIC_A + MIC_{BA} / MIC_B$$

The data were analysed after calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI) as follows:

Where MIC_{AB} equals the MIC of drug A in combination with drug B; MIC_A is the MIC of drug A alone; MIC_{BA} equals the MIC of drug B in combination with drug A and MIC_B is the MIC of drug B alone. The interaction is considered synergistic for FICI < 0.5; additive (0.5 ≤ FICI ≤ 1); indifferent (1 < FICI ≤ 4) and antagonistic (FICI > 4) (Agertt et al. 2013).

RESULTS

Physicochemical characterisation of liposomes - UA-Lipo prepared with a 14:1 lipid:drug molar ratio (80 mM of lipids) exhibited a mean particle size of 146.46 ± 1.91 nm, PDI of 0.32 ± 0.01 , surface charge of $+ 21.30 \pm 0.51$ mV and the drug efficiency ratio was practically 100% ($99.56 \pm 0.74\%$).

Antimycobacterial activity - MIC - The antimycobacterial activity of UA, UA-Lipo, as well as reference drugs against MDR-TB clinical isolates is shown in Table I. The susceptibility of each Mtb strain to UA and UA-Lipo were 31.25 $\mu\text{g/mL}$ and 0.98 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for all the strains tested while the MIC of INH and RIF varied. As expected, 0.5% methanol and empty liposomes did not exhibit any antimycobacterial activities.

TABLE I
Antimycobacterial activity of compounds tested against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates

| <i>M. tuberculosis</i> strains | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|--------------------------------|--------------------------|----------|-------|---------|
| | INH | RIF | UA | UA-Lipo |
| H37Rv | < 0.25 | < 0.12 | 31.25 | 0.98 |
| 1412 | ≥ 16 | 4 | 31.25 | 0.98 |
| 1619 | 16 | 8 | 31.25 | 0.98 |
| 0729 | ≥ 16 | ≥ 8 | 31.25 | 0.98 |
| 1411 | 16 | 8 | 31.25 | 0.98 |
| 1409 | 4 | ≥ 8 | 31.25 | 0.98 |
| 1484 | ≥ 16 | ≥ 8 | 31.25 | 0.98 |

H37Rv: virulent strains; INH: isoniazid; MIC: minimum inhibitory concentration; RIF: rifampicin; UA: usnic acid; UA-Lipo: usnic acid encapsulated into liposomes.

Checkerboard method - The in vitro interactions were evaluated in two MDR-TB isolates (1619 and 1411) as these isolates presented the MIC values set for the reference and tested drugs. The interaction results of UA and UA-Lipo with INH and RIF against MDR-TB isolates are shown in Table II. The FICI of the combinations UA/INH and UA-Lipo/INH ranged from 1.30-2.5, exhibiting an indifferent effect. However, the combinations of UA/RIF and UA-Lipo/RIF exhibited a synergistic effect, resulting in a value below the threshold used to determine synergism (FICI < 0.5).

DISCUSSION

In this paper, conventional liposomes were selected as vehicles for UA because they are suitable carriers for antibiotics used in the treatment of intracellular pathogens, such as Mtb (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach 2010).

Lira et al. (2009) reported a high encapsulation ratio of UA of approximately 96%, in their pioneer paper on liposomes containing UA (10:1 lipid:drug molar ratio, 42 mM of lipids). The present results indicate that the increase in the total lipid concentrations to 80 mM influenced the drug loading in liposomes (UA = 2 mg/mL), in comparison with our previous study (42 mM of lipids and UA = 1.5 mg/mL) (Lira et al. 2009).

Initially, the resistance of all the clinical isolates used in the present paper was thus confirmed, given that Ganihigama et al. (2015) reported MDR-TB isolates based on their resistance to INH and RIF (MIC values of 2- ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$).

The antimycobacterial activity of UA is in agreement with those reported in the literature. Honda et al. (2010) evaluated the anti-tubercular activity of lichen derivatives against Mtb (H37Rv), including UA, with a MIC of 62.5 $\mu\text{g/mL}$. In the same year, Ramos and Silva determined the antimycobacterial activity of UA against resistant and susceptible Mtb clinical isolates. They found MIC values of 12.25 $\mu\text{g/mL}$ for the standard sensitive strain H₃₇Rv and 1.56-12.5 $\mu\text{g/mL}$ for Mtb clinical iso-

TABLE II
Effect of usnic acid or UA-into liposomes in combination with isoniazid or rifampicin against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates

| Combination | MDR-TB clinical isolates | MIC in combination ($\mu\text{g/mL}$) | | | | FICI | Interaction |
|-------------|--------------------------|---|---------|-----|------|------|-------------|
| | | UA | UA-Lipo | INH | RIF | | |
| UA/INH | 1619 | 31.25 | - | 4 | - | 1.30 | Indifferent |
| | 1411 | 62.5 | - | 16 | - | 2.50 | Indifferent |
| UA-Lipo/INH | 1619 | - | 0.98 | 16 | - | 2.00 | Indifferent |
| | 1411 | - | 62.5 | 4 | - | 2.25 | Indifferent |
| UA/RIF | 1619 | 7.81 | - | - | 0.5 | 0.31 | Synergistic |
| | 1411 | 7.81 | - | - | 1 | 0.38 | Synergistic |
| UA-Lipo/RIF | 1619 | - | 0.122 | - | 1 | 0.25 | Synergistic |
| | 1411 | - | 0.245 | - | 0.25 | 0.28 | Synergistic |

FICI: fractional inhibitory concentration index; INH: isoniazid; MDR-TB: multidrug-resistant *M. tuberculosis*; MIC: minimum inhibitory concentration; RIF: rifampicin; UA-Lipo: usnic acid encapsulated into liposomes.

lates with monoresistance to INH, SM or RIF. Regarding the UA-Lipo, all isolates exhibited MIC values (0.98 µg/mL) more than 30-fold lower than UA alone. This phenomenon observed in MIC for all isolates may be explained in the sense of these strains have never come into contact with UA and UA-Lipo earlier, and thus have a certain degree of susceptibility and uniformity.

One possible explanation for the enhancement of antimicrobial activity owing to the encapsulation of UA into liposomes may be attributed to electrostatic interactions between negatively-charged carboxyl groups of mycolic acids, which are the main components of the Mtb cell wall (Pineiro et al. 2013), and positively-charged liposomal vesicles. In addition, liposomes and bacteria can interact directly by fusion processes, leading to the release of the encapsulated antibiotic within the bacteria (Sachetelli et al. 2000).

Other authors also have found that the encapsulation of antibiotics into liposomes enhances the antimycobacterial activity as compared with pure drugs. In 2009, Changsan et al. (2009) encapsulated RIF into liposomes using the thin film method. The MIC value of RIF encapsulated into liposomes against *Mycobacterium bovis* was 0.2 µM, whereas the MIC of RIF was higher (0.8 µM), thus indicating that liposomes were more efficient. Recently, Rojanarat et al. (2012) prepared proliposomes containing levofloxacin (LEV-proliposome) and its activity against *M. bovis* was assessed. The antimycobacterial activity of LEV-proliposomes was higher than LEV (MIC = 0.5 and 1 µg/mL, respectively). These *in vitro* results demonstrate that the encapsulation of drugs into liposomes may boost their antimycobacterial activity.

Yempala et al. (2013) synthesised novel dibenzofuran derivatives through molecular hybridisation and evaluated their antimycobacterial activity against Mtb H37Rv. Among the compounds analysed the lowest MIC value was 3.12 µg/mL. In comparison with our results, one may state that the encapsulation of UA into liposomes was three times more effective than the new UA derivatives.

The checkerboard method was used to verify the possible interaction effects of the combination of drugs on the antimicrobial activity of the compounds tested against Mtb. The drug combination regimens could lead to successful therapeutic schemes for TB treatment, considering MDR-TB isolates can rapidly develop resistance to new drugs, especially those redesigned from the existing scaffolds of the currently used anti-TB drugs (Ganihigama et al. 2015).

In synergism, the drugs involved can affect different targets in the microorganisms (Rastogi et al. 1998, Agertt et al. 2013). Thus the result obtained with the combinations of UA and UA-Lipo with RIF demonstrated an enhancement of their antimycobacterial activity, when compared with the effect of both drugs used separately.

Bapela et al. (2006) were pioneers in experiments combining natural products with antituberculous agents, such as INH and RIF. The combinations of INH or RIF with 7-methyljuglone, a natural product isolated from *Euclea natalensis*, reduced MIC values four fold and eightfold, respectively. Results showed a synergistic effect for both combinations against Mtb isolates.

In 2013, Rey-Jurado et al. (2013) evaluated the *in vitro* effect of combinations between antituberculous agents such as INH, RIF and EMB against drug-susceptible clinical isolates. The FICI values for all isolates were 1.5, showing indifferent effect. We can, therefore, say that our results of combinations between UA or UA-Lipo and RIF were more effective than the first-line drug combinations proposed by those authors.

Thus, UA-Lipo may be used as a dosage form to improve the antimycobacterial activity of RIF, a first-line drug for the treatment of infections caused by Mtb.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the team of the Keizo-Asami Immunopathology Laboratory of the Federal University of Pernambuco (LIKA/UFPE) and the Central Public Health Laboratory of Pernambuco (LACEN/PE, Brazil), for their invaluable technical support.

REFERENCES

- Agertt VA, Marques LL, Bonez PC, Dalmolin TV, Oliveira GNM, Campo MMA. Evaluation of antimycobacterial activity of a sulfonamide derivative. *Tuberculosis*. 2013; 93: 318-321.
- Bapela NB, Lall N, Fourie FB, Franzblau SG, Van Rensburg CEJ. Activity of 7-methyl-juglone in combination with antituberculous drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytomedicine*. 2006; 13: 630-635.
- Changsan N, Nilkaeo A, Punggrassami P, Srichama T. Monitoring liposomes containing rifampicin on respiratory cell lines and *in vitro* against *Mycobacterium bovis* in alveolar macrophages. *J Drug Target*. 2009; 17: 751-762.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility of *Mycobacteria, nocardiae*, and other aerobic actinomycetes. Approved standard, 2nd ed. CLSI document M24-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int J Pharm*. 2010; 387: 187-198.
- El-Ridy MS, Mostafa DH, Shehab A, Nasr EA, El-Alim SA. Biological evaluation of pyrazinamide liposomes for treatment of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Pharm*. 2007; 330: 82-88.
- Ganihigama DU, Sureram S, Sangher S, Hongmanee P, Aree T, Mahidol C, et al. Antimycobacterial activity of natural products and synthetic agents: pyrrolodiquinolines and vermelhotin as antitubercular leads against clinical multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem*. 2015; 89: 1-12.
- Gaspar MM, Cruz A, Penha AF, Reymão J, Sousa AC, Eleutério CV, et al. Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31: 37-45.
- Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, Leite SR, Micheletti AC, Lopes TIB, et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine*. 2010; 17: 328-332.
- Ingólfssdóttir K, Chung GAC, Skúlason VG, Gissurarson SR, Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *Eur J Pharm Sci*. 1998; 6: 141-144.
- Kaur IP, Singh H. Nanostructured drug delivery for better management of tuberculosis. *J Control Release*. 2014; 184: 36-50.
- Lira MCB, Siqueira-Moura MP, Rolim-Santos HML, Galetti FCS, Simioni AR, Santos NP, et al. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Liposome Res*. 2009; 19: 49-58.

334 *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 111(5), May 2016

- Marshak A, Kuschner M. The action of streptomycin and usnic acid on the development of tuberculosis in Guinea pigs. *Public Health Reports*. 1950; 65: 131-144.
- Mukherjee JS, Rich ML, Socci AR, Joseph JK, Virú FA, Shin SS, et al. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Lancet*. 2004; 363: 474-481.
- Pham DD, Fattal E, Tsapis N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. *Int J Pharm*. 2015; 478: 517-529.
- Pinheiro M, Giner-Casares JJ, Lúcio M, Caio JM, Moiteiro C, Lima JLFC, et al. Interplay of mycolic acids, antimycobacterial compounds and pulmonary surfactant membrane: A biophysical approach to disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1828: 896-905.
- Ramos DF, Silva PEA. Antimycobacterial activity of usnic acid against resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria. *Pharm Bio*. 2010; 48: 260-263.
- Rastogi N, Goh KS, Horgen L, Barrow WW. Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998; 21: 149-157.
- Rey-Jurado E, Tudó G, Bellacasa JP, Espasa M, González-Martín J. *In vitro* effect of three-drug combinations of antituberculous agents against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 41: 278-280.
- Rojanarat W, Nakpheng T, Thawithong E, Yanyium N, Srichana T. Levofloxacin-proliposomes: opportunities for use in lung tuberculosis. *Pharmaceutics*. 2012; 4: 385-412.
- Sachetelli S, Khalil H, Chen T, Beaulac C, Sénéchal S, Lagacé J. Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1463: 254-266.
- WHO - World Health Organization. Global tuberculosis report. 2013. Available from: who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf.
- Yempala T, Sridevi JP, Yogeewari P, Sriram D, Kantevari S. Design, synthesis and antitubercular evaluation of novel 2-substituted-3H-benzofuro benzofurans via palladium-copper catalysed sonogashira coupling reaction. *Bioorg Med Chem*. 2013; 23: 5393-5396.