

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

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

João Paulo de Lucena Laet

**Avaliação da atividade antimicobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e podofilotoxina contra micobactérias não tuberculosas**

Recife

2022

João Paulo de Lucena Laet

**Avaliação da atividade antimicobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e podofilotoxina contra micobactérias não tuberculosas**

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Doutora Haiana Charifker Schindler  
Coorientadora: Doutora Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel

Recife  
2022

Título do trabalho em inglês: Evaluation of *in vitro* antimycobacterial activity of dihydrosphingosine analogs and podofilotoxine against non-tuberculous mycobacteria.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

L158a Laet, João Paulo de Lucena.  
Avaliação da atividade antimicobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e podofilotoxina contra micobactérias não tuberculosas / João Paulo de Lucena Laet. -- 2022.  
62 p. : il.color.

Orientadora: Haiana Charifker Schindler.  
Coorientadora: Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2022.  
Bibliografia: f. 55-62.

1. Micobactérias não tuberculosas. 2. Testes de Sensibilidade Microbiana.  
3. Preparações Farmacêuticas. 4. Sinergismo farmacológico. I. Título.

CDU 614

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239  
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

João Paulo de Lucena Laet

**Avaliação da atividade antimicrobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e podofilotoxina contra micobacterias não tuberculosas**

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 3 de novembro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

*Dra. Haiana Charifker Schindler*

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

*Dra. Valeria Pereira Hernandes*

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

*Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto*

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico esta  
dissertação a  
minha avó Maria José  
(*in memoriam*), que  
sempre acreditou no  
meu potencial e que  
continua sendo um  
exemplo de amor e  
gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Luciene e Eduardo, por tudo que representam em minha vida, pelo apoio de sempre, dedicação, carinho, amor e orientações. Se cheguei aqui devo tudo a vocês.

Aos meus irmãos, Eduardo e Maria Eduarda, por todas nossas conversas importantes ou não, pela preocupação de sempre comigo e pelo amor, carinho e risadas que fazem da nossa família ser única.

A minha tia Lúcia, que sempre esteve ao meu lado, por tudo que representa na minha vida e pelo carinho, amor e por ser a minha segunda mãe.

A minha namorada Katharina Cruz, que desde o final da graduação vem me aguentando e que apesar de todas as dificuldades sempre esteve ao meu lado. Obrigado por aguentar minhas reclamações e por sempre demonstrar amor quando precisei.

As minhas orientadoras, Dra Haiana Schindler e Dra Lílian Montenegro pela oportunidade dada a mim desde a graduação e por acreditarem no meu potencial de dar continuidade a uma linha de pesquisa do laboratório. Agradeço também por disponibilidade de sempre para os ensinamentos necessários.

Aos meus amigos que fiz no laboratório, os quais desejo todo sucesso do mundo. Em que não posso deixar de citar: Luanna, Romário, Danyele e Laryssa. Esse passo que estou dando na minha carreira não aconteceria sem vocês para tornar o nosso ambiente loucura agradável.

Aos outros amigos de laboratório que também se tornaram de vida, Danielle, Giovanna, Renata e Rayssa, por estarem sempre compartilhando experiências, ajudando um ao outro nas incertezas do dia a dia, e por todos os momentos de diversões que tivemos.

Aos demais integrantes do Laboratório de Imunoepidemiologia, pela rotina que vivemos no laboratório, pelas trocas de conhecimento e por todo o aprendizado fornecido que foram essenciais na minha formação profissional.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por toda a infraestrutura oferecida, bem como seus funcionários.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que não foram citados aqui, mas que de forma direta ou indireta sempre torceram por mim e contribuíram para que este momento pudesse se concretizar.

## RESUMO

Laet, João Paulo de Lucena. Avaliação da atividade antimicobacteriana *in vitro* de análogos da diidroesfingosina e podofilotoxinas contra micobactérias não tuberculosas. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

As micobactérias não tuberculosas (MNT) surgem como um problema de saúde pública principalmente pelo aumento de casos mundialmente nos últimos anos. Somando a isto, a capacidade de resistir aos principais antibióticos e desinfetantes aumentou a importância do controle desses agentes nos sistemas de saúde. As MNT são tratadas com vários medicamentos reaproveitados de outras doenças, principalmente da tuberculose por ser mesmo gênero *Mycobacterium*. O tratamento é tóxico, com muitos efeitos colaterais e não possui uma alta taxa de cura. Há uma necessidade urgente de novas drogas que sejam eficazes e otimizadas para o tratamento das MNT. O objetivo deste estudo é caracterizar a atividade farmacológica de compostos análogos a diidroesfingosina e podofilotoxinas como possível protótipo de droga contra micobactérias não tuberculosas. Dos 41 compostos testados, 11 demonstraram atividade contra *M. smegmatis*, *M. avium* e *M. kansasii* - CIM variando entre 4 a 8  $\mu\text{M}$ . Observamos também que os compostos que apresentaram as melhores CIM conseguiram desempenhar nos testes de CC50 uma viabilidade celular nas mesmas concentrações apresentadas na CIM. Por fim, testamos os cinco compostos que tiveram o melhor desempenho combinada com rifampicina e amicacina e os 5 compostos demonstraram efeito indiferente (FICI = 0,5) em *M. smegmatis* e *M. avium*, demonstrando a possibilidade do uso combinado com os fármacos convencionais. Dessa forma, os achados deste estudo demonstram o potencial de um derivado diidroesfingosina e da podofilotoxina em ser uma substância candidata ao processo de desenvolvimento de um composto protótipo de estudos pré-clínicos para tratamento das micobactérias não tuberculosas.

**Palavras-chaves:** micobactérias não tuberculosas; teste de sensibilidade microbiana; preparações farmacêuticas; sinergismo farmacológico

## ABSTRACT

Laet, João Paulo de Lucena. In vitro evaluation of the antimycobacterial activity of dihydroceramide analogs and podophyllotoxins against nontuberculous mycobacteria. 2022. Dissertation (Master's in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2022.

Nontuberculous mycobacteria (NTM) have become a public health problem due to the increase in cases worldwide in recent years. In addition, their ability to resist main antibiotics and disinfectants has increased the importance of controlling these agents in healthcare systems. NTM are treated with several drugs repurposed from other diseases, mainly tuberculosis, as they belong to the same *Mycobacterium* genus. Treatment is toxic, with many side effects and does not have a high cure rate. There is an urgent need for new drugs that are effective and optimized for the treatment of NTM. The aim of this study is to characterize the pharmacological activity of dihydroceramide analogs and podophyllotoxins compounds as a possible prototype drug against nontuberculous mycobacteria. Of the 41 compounds tested, 11 showed activity against *M. smegmatis*, *M. avium*, and *M. kansasii* - with MIC ranging from 4 to 8  $\mu\text{M}$ . We also observed that the compounds that showed the best MIC were able to maintain cell viability at the same concentrations in the CC50 tests. Finally, we tested the five compounds that performed the best combined with rifampicin and amikacin, and all five compounds showed indifferent effect (FICI = 0.5) in *M. smegmatis* and *M. avium*, demonstrating the possibility of combined use with conventional drugs. Thus, the findings of this study demonstrate the potential of a dihydroceramide derivative and podophyllotoxin as a candidate substance in the process of developing a prototype compound for preclinical studies for the treatment of nontuberculous mycobacteria.

**Key words:** nontuberculous mycobacteria; microbial sensitivity tests; pharmaceutical preparations; drug synergism



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede celular de Gram +, Gram - e Micobactérias.....	16
Figura 2 - Estrutura Geral da Rifampicina .....	20
Figura 3 - Estrutura Geral da Pirazinimida .....	21
Figura 4 - Estrutura Geral do Etambutol.....	22
Figura 5 - Estrutura Geral da Isoniazida.....	23
Figura 6 - Estrutura Geral dos Aminoglicosídeos .....	25
Figura 7 - Estrutura Geral dos Macrolídeos.....	26
Figura 8 - Estrutura Geral das Fluorquinolonas.....	27
Figura 9 - Estrutura Geral da Bedaquilina .....	28
Figura 10 - Estrutura Geral de diidroesfingosinas .....	31
Figura 11 - Estrutura Geral das podofilotoxinas .....	34
Figura 12 - Citotoxicidade dos compostos AFJ em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50) .....	46
Figura 13 - Citotoxicidade dos compostos OFJ em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50) .....	47

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação Proposta por Runyon. ....	17
Quadro 2 - Pipeline de desenvolvimento de fármacos em ensaios clínicos.....	29
Quadro 3 - Série de compostos do tipo diidroesfingosina otimizados e sintetizados.	32
Quadro 4 - Série de compostos do tipo podofilotoxinas otimizados e sintetizados. ..	33
Quadro 5 - Série de compostos do tipo podofilotoxinas otimizados e sintetizados. ..	33
Quadro 6 - Atividade antimicobacteriana dos derivados do tipo diidroesfingosina frente a cepas de micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido e lento através da concentração inibitória mínima.....	40
Quadro 7 - Atividade antimicobacteriana dos derivados do podofilotoxina classe AFJ frente a cepas de micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido e lento através da concentração inibitória mínima .....	42
Quadro 8 - Atividade antimicobacteriana dos derivados do podofilotoxina classe OFJ frente a cepas de micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido e lento através da concentração inibitória mínima. ....	43
Quadro 9 - Concentração inibitória fracionada resultante da interação <i>in vitro</i> dos compostos selecionados e antimicobacterianos de primeira e segunda linha em cepa de <i>M. avium</i> .....	48
Quadro 10 - Concentração inibitória fracionada resultante da interação <i>in vitro</i> dos compostos selecionados e antimicobacterianos de primeira e segunda linha em cepa de <i>M. smegmatis</i> .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
CC50	Concentração citotóxica que reduz cinquenta por cento da viabilidade celular
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMTB	Complexo Mycobacterium tuberculosis CMTB
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSPH	Diidroesfingosina
EMB	Etambutol
INH	Isoniazida
LJ	Löwenstein-Jensen
MNT	Micobacterias não tuberculosas
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Msm	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
Mk	<i>Mycobacterium kansasii</i>
MAC	Mycobacterium avium
MTT	(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaOH	Hidróxido de sódio
OADC	Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
SPH	Esfingosina
TB	Tuberculose

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 Histórico da Micobactérias.....	16
2.2 Epidemiologia das Microbactérias Não Tuberculosas.....	17
2.3 Tratamento.....	20
2.3.1 Rifampicina.....	20
2.3.2 Pirazinamida.....	21
2.3.3 Etambutol .....	22
2.3.4 Isoniazida .....	23
2.3.5 Aminoglicosídeos .....	24
2.3.6 Macrolídeos.....	25
2.3.7 Fluorquinolonas.....	26
2.3.8 Bedaquilina.....	27
2.4 Desenvolvimento de novas drogas .....	28
2.5 Novos agentes terapêuticos.....	30
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo geral .....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Síntese dos Compostos.....	32
4.2 Testes Biológicos in vitro.....	35
4.2.1 Microrganismos .....	35
4.2.2 Antimicrobianos de Referência.....	35
4.2.3 Determinação de atividade antimicobacteriana in vitro .....	36
4.2.4 Determinação da Citotoxicidade (CC50) .....	36
4.2.5 Determinação da interação farmacológica in vitro.....	38
4.3 Análise estatística .....	38
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.1 Atividade antimicobacteriana.....	40
5.2 Atividade da citotoxicidade .....	45
5.3 Avaliação da interação farmacológica in vitro .....	48
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>

<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As micobactérias não tuberculosas (MNT) são patógenos de vida livre causadoras de infecções oportunistas. Essas espécies fazem parte do gênero *Mycobacterium*, que é representado, também, pelo Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Atualmente, existem mais de 100 espécies de MNT descritas, em que aproximadamente um terço dessas espécies estão associadas a doenças em humanos. (CARNEIRO et al., 2018).

MNT são consideradas um grupo de microrganismos de importância clínica, principalmente pela capacidade de causar diversas infecções em humanos e por terem sintomas muito similares com a tuberculose. Nos últimos anos, foi possível observar um aumento no interesse crescente na literatura pelas MNT, possivelmente pelo aumento da incidência de infecções no mundo (PREVOTS; MARRAS, 2015).

Diversas classificações foram propostas para as micobactérias nos últimos anos (HOEFSLOOT et al., 2013). Essas classificações são baseadas em várias características, sendo elas: genótipo, tempo de crescimento, patogenicidade, origem, habitat e relação agente-hospedeiro. A classificação mais habitual é a de Runyon (RUNYON, 1959), que classifica as MNT de acordo com o tempo de crescimento e a pigmentação das colônias.

Com o aumento de casos por espécies de MNT, um dos grandes desafios que surgiram é a necessidade de otimizar o tratamento para MNT, principalmente pelo alto potencial de resistência, junto a falta de um tratamento eficaz e a toxicidade do regime atual. O processo de resistência de fármacos tem aumentado com o passar dos anos, demandando uma maior atenção e cuidado na utilização de medicamentos (SCHITO; HANNA; ZUMLA, 2017).

Por consequência, o desenvolvimento de novas drogas principalmente para doenças que não são de classificação obrigatória e que possuem resistência tanto a fármacos como desinfetantes químicos, torna o processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) ainda mais complexo (RATNUNGA et al, 2020). Atualmente, o tratamento eficaz é desafiador por vários fatores, sendo eles: longo tempo de duração com os medicamentos, alta toxicidade, poucos resultados na eliminação da doença e a presença de resistência.

A resistência das MNT pode ser classificada em intrínseca ou adquirida, quando falamos de resistência intrínseca é justamente por mecanismos que são mais conhecidos, como paredes celulares impermeáveis, formação de granulomas que diminuem o fluxo dos antimicrobianos e a expressão de proteínas. A resistência adquirida é relacionada a prescrição e uso prolongado de antibióticos para tratar as MNT, em que a utilização de certos antibióticos sem o acompanhamento pode levar o abandono das drogas que possuem um histórico de efeitos colaterais graves e dessa forma levar ao aumento da resistência pelas cepas de MNT (WU et al, 2018)

De acordo com a American Thoracic Society (ATS), é necessário seguir uma sequência de critérios antes de iniciar o tratamento. Dentre esses critérios, o teste de susceptibilidade ao antibiótico (TSA) é uma das etapas fundamentais. A partir disso, é possível mapear o tratamento do paciente (GRIFFITH, et al 2007).

Atualmente, o regime de tratamento é dividido de acordo com o crescimento de cada espécie. Para as cepas de crescimento lento é utilizado o etambutol, rifampicina e macrolídeo, sendo possível adotar amicacina ou estreptomicina em casos graves (JARAND et al, 2011). Já para as cepas de crescimento rápido, são utilizadas macrolídeos, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e outras drogas de acordo com o resultado obtido no TSA. No presente momento, a taxa de sucesso do tratamento está relacionada ao tipo de espécie, por exemplo, cepas de crescimento lento como *M. avium* e *M. kansasii* apresentaram uma taxa de cura de 50 a 70% e 80 a 90%, respectivamente (BROWN-ELLIOT; NASH; WALLACE JR, 2012).

Portanto, é fundamental a realização P&D de novas drogas, com capacidade de encurtar o tratamento, serem mais eficazes no tratamento e com uma menor toxicidade. Nos últimos anos, pesquisas científicas no desenvolvimento de novas drogas anti-TB e MNT têm sido enfaticamente produzidas. Atualmente, alguns compostos estão em fase de desenvolvimento clínico, enquanto outros estão em fase de investigação pré-clínica, na tentativa da descoberta de novas moléculas para serem usadas no tratamento de micobactérias (SHEHZAD et al., 2013). A molécula mais recente a ser introduzida foi a bedaquilina (TMC207), molécula que teve sua reformulação alterada após testes *in silico* contra a cepa de *M. smegmatis* (COHEN, 2013).

A busca por nova moléculas é essencial na introdução de um novo protótipo de droga. A podofilotoxina é uma ciclolignana natural, presente em várias espécies do

gênero *Berberidaceae* (SILVEIRA et al 2014). O uso de derivados naturais como novos agentes terapêuticos é bem difundido na literatura, atualmente mais da metade dos medicamentos disponíveis são de origem natural ou derivados deles (KARIKAS, et al, 2010). Essa classe tem seu interesse como agente terapêutico desde a década de 40, quando o composto desempenhou atividade como agente cancerígeno. No entanto, o fármaco apresentou uma alta toxicidade gastrointestinal sendo associadas a vários efeitos colaterais como náuseas, vômitos e diarreia. Apesar disso, essa classe possui uma atividade antiviral conhecida e é utilizada no tratamento de verrugas e da psoríase.

Com o avanço da química farmacêutica, a possibilidade de reformulação dos compostos é uma das principais etapas no desenvolvimento de novos protótipos de drogas. Dessa forma, é possível acontecer introdução de um novo elemento químico na cadeia do composto e ser posteriormente observado seu efeito *in vitro*. Atualmente, a podofilotoxina tornou-se o material de partida para a preparação de novos fármacos sendo esses agentes antitumorais com melhor índice terapêutico (CASTRO et al., 2003) e possui sua atividade antileishmania testada mostrando que o composto tem um espectro de ação amplo.

Outra classe natural com um potencial referenciado na literatura é a esfingosina (SPH). A SPH um componente básico dos esfingolipídios e ceramidas. É biossintetizada da serina e ácido palmítico, através do seu precursor dihydrosfingosina saturado (DSPH). A Esfingosina-1-fosfato (S1P), a forma ativada do SPH, está envolvida em alguns processos biológicos, incluindo a mobilização do  $Ca^{2+}$ , o crescimento celular, diferenciação, motilidade e organização do citoesqueleto. Tem sido relatado que o papel de SPH, S1P, ceramidas e outros componentes lipídicos em endossomas que contém o *Mycobacterium* levam à ativação de lisossomos de células infectadas pelo bacilo. Assim, segundo a literatura é possível de utilização de esfingonálogos como protótipos na busca por drogas eficazes no ataque de reservatório do *Mycobacterium* (OLMO et al., 2009).

Diante disso, este estudo buscou avaliar a ação de um número selecionado de novos derivados análogos da diidroesfingosina e podofilotixona contra as MNT, com o objetivo de descobrir potenciais novos protótipos terapêuticos contra essa família do gênero *Mycobacterium*.

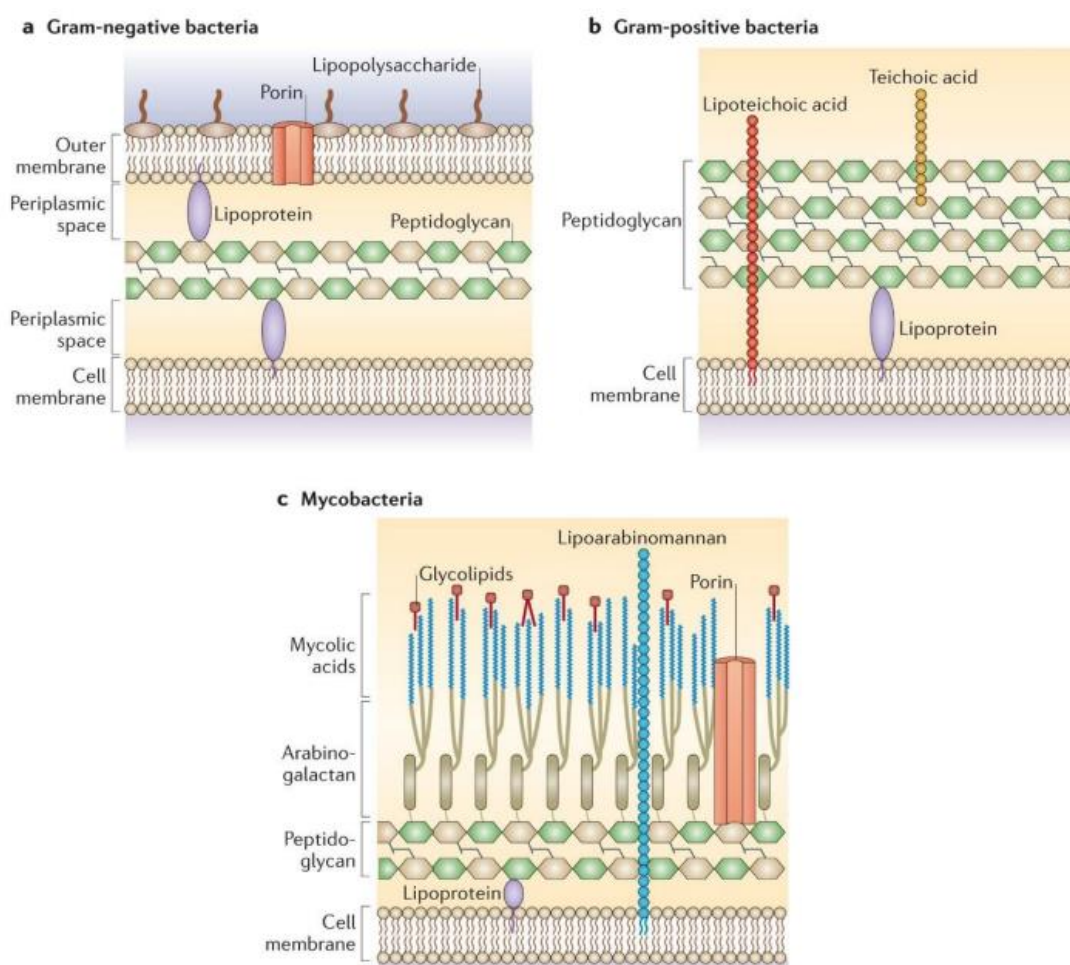


## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico da Micobactérias

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae* e ordem dos *Actinomycetales*. O gênero abrange espécies saprofíticas, bem como patógenos obrigatórios e facultativos. Essa família possui apenas o gênero *Mycobacterium*, caracterizada pela presença de ácidos micólicos na parede celular. (SOMOSKOVI; SALFINGER, 2014). A presença desses ácidos graxos em elevada concentração evita a destruição da micobactéria por mecanismos microbicidas dos macrófagos, formando uma barreira impermeável que impede o acesso de substâncias hidrofílicas e fármacos (BROWN et al, 2015).

Figura 1 - Estrutura da parede celular de Gram +, Gram - e Micobactérias



Fonte: Adaptado de BROWN et al, 2015

Além disso, as micobactérias não tuberculosas são um grupo de microrganismos de importância clínica, já que existem múltiplas espécies que causam diversas infecções em humanos, com morbidade e mortalidade importantes, principalmente por terem sinais e sintomas muito similares com a tuberculose. São classificadas como bacilos aeróbicos, retos ou ligeiramente curvos, imóveis, não esporulados, não encapsulados, que medem de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura. Sua principal característica é possuir álcool-ácido resistência, uma vez corados, resistente a descoloração por solução álcool e ácida, sendo por isso, denominados bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) (GRIFFITH, et al., 2007).

A descrição das MNT surgiu no final do século XIX, muito tempo após a descrição do agente etiológico da tuberculose (TB) feita por Robert Koch em 1882 (JOHNSON; ODELL, 2014). Desde então, mais de 170 espécies foram identificadas e fazem parte do nosso dia a dia. Conhecida por estarem presentes em vários habitats as micobactérias não tuberculosas podem ser encontradas nos mais variados sistemas, sendo possível identificar espécies no mar, bem como nos encanamentos da rede doméstica de água. Além disso, várias espécies são localizadas no campo, principalmente em solos ricos, que fornecem um ambiente com grandes oportunidades de contaminação (HONDA et al, 2016). A classificação mais utilizada para as espécies de MNT é a de RUNYON (1959), proposta apenas para diferenciação de características entre as cepas (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação Proposta por Runyon

<b>Tempo de Crescimento</b>	<b>Característica da Cultura</b>	<b>Pigmentação</b>
Crescimento Lento	Fotocromógenas	Desenvolvem pigmentação amarela somente quando expostas a luz ( <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> )
	Escotocromógenas	Desenvolvem pigmentação com a presença ou não da luz ( <i>M. goodii</i> , <i>M. szulgai</i> )
	Acrógenas	Não ocorre a produção de pigmentação ( <i>M. avium</i> )
Crescimento Rápido		Podem apresentar pigmentação ou não ( <i>M. fortuitum</i> , <i>M. Chelonae</i> )

Fonte: Adaptado de Runyon (1959)

## 2.2 Epidemiologia das Micobactérias Não Tuberculosas

Ao contrário da *M. tuberculosis (Mtb)*, as MNT estão amplamente distribuídas no meio ambiente, podendo ser isoladas em água, solo, animais, equipamentos cirúrgicos e, inclusive, em soluções desinfetantes (LEAO et al., 2004). A infecção pode ocorrer por inalação, inoculação ou ingestão de material contaminado por micobactérias, podendo causar doenças pulmonares e extrapulmonares, no entanto, recentemente vários relatos clínicos de casos de MNT indicam transmissão de pessoa para pessoa (BRYANT et al, 2016).

A maioria das MNT são capazes de multiplicar-se mesmo em condições de escassez nutricional, altas temperaturas e extremos de pH. Além disso, devido à hidrofobicidade de sua parede celular, são resistentes ao glutaraldeído e aos processos de cloração utilizados para o tratamento de água, possuindo a capacidade de formar biofilme como um mecanismo de sobrevivência (COWMAN; WILSON; LOEBINGER, 2016). O impacto destas características pode ser observado, por exemplo, em estudos que demonstraram o isolamento de MNT, principalmente da *M. avium*, em redes de fornecimento de água tratada para consumo humano, que se tornam fonte de infecção dessas micobactérias (HOSHINO; SUZUKI, 2015)

Em países com baixa incidência de *Mtb*, a prevalência de MNT é crescente e, por vezes, superiores à tuberculose. Esse aumento de infecções por MNT torna o cenário de doenças infectocontagiosas preocupante, principalmente pela diversidade de espécies encontradas (TRAN et al., 2014). Estudos recentes demonstram uma variedade ampla da distribuição geográfica das MNT (LAI et al., 2008), além de ser uma doença que consegue se espalhar bem pelo mundo, estudos como o de Marras e colaboradores (2007) mostram que a taxa de prevalência de MNT na América do Norte subiu 9,1 para 14,1 por 100.000 pessoas/ano.

No Brasil, o primeiro caso de infecção por MNT ocorreu no Rio de Janeiro, a partir disso, a importância clínica da MNT na patogenicidade humana vem sendo observada. No entanto, por não serem de doenças de notificação obrigatória os registros oficiais tornam-se escassos registros oficiais para que se possa ter a noção do impacto e magnitude exata dessas infecções. (BRASIL, 2011)

Apesar do desprovimento de casos anuais de MNT no Brasil, uma das vantagens que o país tem contra outros essa doença é a política da vacina BCG. Estudos demonstraram uma redução de casos de MNT e TB em vários países após a

implementação dessa vacina. Assim, é possível sugerir que a BCG confere proteção cruzada contra MNT o que torna o Brasil num cenário mais confortável por ter uma população extensa que recebeu essa vacina. (ABATE et al, 2019; KONTTURI et al, 2018)

Diferente da TB os casos de MNT são mais frequentes em mulheres e idosos, tendo a cepa de MNT mais comum nesses casos o *M. avium*, sendo essa cepa a melhor distribuída globalmente (WINTHROP et al, 2010). A partir dessa distribuição, estudos mostram que o aumento da incidência e prevalência não é restrito a América do Norte. LAI e Colaboradores (2011), reportaram o aumento da prevalência de 5,5 para 10,2 casos para 100.000 habitantes na Austrália. Cenário similar na Europa, em que os casos de doenças pulmonares causadas por MNT foram de 1,3 casos para 7,9 casos por habitantes segundo MOORE et al (2010).

Mundialmente os casos de MNT estão numa crescente de incidência e prevalência, os estudos demonstram a prevalência de cepas de *M. avium*, *M. chelonae* e *M. kansasii*. Além disso, essas doenças estão associadas a uma série de condições como imunossupressão, idade, sexo e histórico de doença pulmonar.

Dessa forma, como as infecções por MNT não são doenças de notificação obrigatória na maioria dos países, os dados epidemiológicos acabam sendo bem limitados, principalmente em países em desenvolvimento. É possível observar um crescimento de casos no sudeste asiático e na América do Sul, em especial no Brasil (LIMA et al., 2013). Além disso, com o que já é encontrado na literatura é possível observar que as MNT têm sua capacidade de causar sérios problemas de saúde pública aumentada anualmente principalmente pelo potencial de resistência aos fármacos que são utilizados atualmente. A importância de novas pesquisas principalmente epidemiológicas estão concentradas na busca de analisar a situação dessas infecções oportunistas no dia a dia dos pacientes (RATNATUNGA et al, 2020).

## 2.3 Tratamento

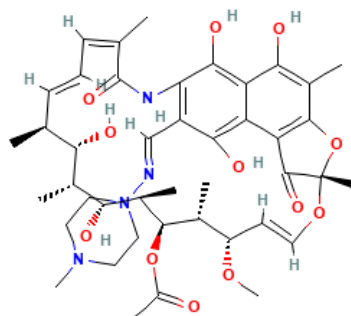
### 2.3.1 Rifampicina

A rifampicina (RMP), quimicamente conhecida como 3-((4-metil-1-piperazinil)iminometil), foi descoberta em 1957 a partir a bactéria *Amycolatopsis mediterranei* (GROSSET, et al., 1998) e isolado pela primeira em vez em 1959 (SENSI, et al., 1983). É um dos fármacos utilizados principalmente no tratamento da TB, sendo considerado um dos medicamentos anti-TB mais eficazes e como mecanismo de ação descritos na literatura.

O mecanismo de ação da RMP é baseado na fase de crescimento da micobactéria, em que o fármaco se acopla à RNA polimerase, bloqueando assim a síntese de RNA mensageiro, responsável pela produção de proteínas essenciais para a informação genética da bactéria, o DNA (FLOSS; YU, 2005). O uso da RMP para tratar as MNT é comumente utilizada frente a *M. kansasii*, *M. avium* principalmente pela sua capacidade de inibir a síntese de proteínas. (SHULHA, ESCALANTE, WILSON, 2019; KHAWBUNG; NATH; CHAKRABORTY, 2020)

No entanto, apesar da RMP ser um fármaco muito utilizado no tratamento da tuberculose, esse fármaco não é capaz de eliminar todas as micobactérias não tuberculosas de interesse clínico, necessitando dessa forma uma análise caso a caso (KOLYVA, KARAKOUSIS, 2012). Além disso, a RMP é conhecida por possuir uma grande quantidade de efeitos adversos é frequente, como: reações cutâneas, intolerância gastrointestinal, síndrome hematológica e coloração laranja dos fluídos do corpo. (SIQUEIRA; GOMES, 2010)

Figura 2 – Estrutura Geral da Rifampicina



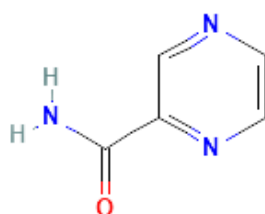
### 2.3.2 Pirazinamida

Pirazinimada (PZA) ou quimicamente conhecida pirazina-2-carboxamida, foi um dos fármacos reconhecidos por encurtar o tratamento da tuberculose de 9 a 12 meses para 6 meses a partir de uma forte combinação com outras drogas (FOX; ELLARD; MITCHISON, 1999)

A PZA é um pró-farmaco, ou seja, é um fármaco inativo que só após uma ativação pode causar efeito. O mecanismo de ação da PZA é conhecido por atravessar a membrana da micobacteria por difusão passiva e posteriormente sendo transformado em ácido pirazinoico. O ácido pirazinoico modifica o meio celular para ácido ocasionando dessa forma alterações nas características de permeabilidade e transporte de membrana, provocando danos celulares (BERTOLOZZI, et al., 2014)

O uso da PZA para tratar micobactérias não tuberculosas não faz parte das recomendações utilizadas na clínica médica (HAWORTH et al, 2017). No entanto, pelo difícil diagnóstico que as MNT possuem muitos tratamentos são iniciados com suspeita de *Mtb* o que leva ao uso da PZA como droga escolhida no tratamento. Dessa forma, a eficácia do tratamento acaba sendo garantida em cepas mais comuns como *M. avium* e *M. kansasii* que são afetadas principalmente pela RMP. (GOPALASWAMY et al , 2020).

Figura 3 – Estrutura Geral da Pirazinimida



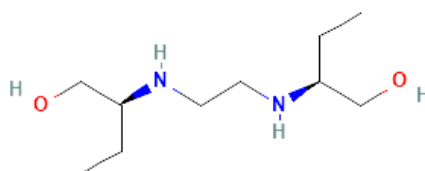
### 2.3.3 Etambutol

O etambutol (EMB), ou como é conhecido quimicamente como dextro-etilenodiimino-di-1-butanol-dihidroclorid, 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. (ROSSETTI, et al., 2002). O EMB foi sintetizado em 1960, porém apenas em 1968 começou a ser empregado no tratamento. (DE SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

Um aspecto da ação do EMB, é a sua atividade bacteriostática. O mecanismo de ação não possui conhecido, mas acredita-se que envolve diversas atividades celulares (LARSEN et al., 2017). Segundo Zimmerman e colaboradores (2017), o mecanismo mais provável é a inibição de enzimas arabinosil transfereases que estão envolvidas na biossíntese da parede celular.

A utilização desse fármaco contra as MNT é pela sua capacidade de gerar uma inibição do arabinogalactano que conecta a membrana celular externa da micobacteria à parede celular de peptidoglicano, levando a sua lise. Como o etambutol é capaz de reduzir a barreira hidrofóbica (membrana externa e parede celular), ele é comumente utilizado em associação a outros medicamentos da terapia medicamentosa, apesar de não ser uma droga de primeira escolha (FALKINHAM III, 2018).

Figura 4 – Estrutura Geral do Etambutol



Fonte: Adaptado Pubchem (2019)

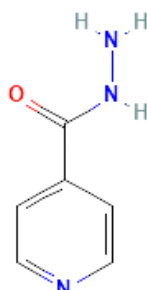
### 2.3.4 Isoniazida

A Isoniazida (INH), quimicamente conhecida como hidrazida ou ácido isonitrico, foi descoberta em 1952 e é um dos principais medicamentos utilizados no tratamento, sendo o mais antigo fármaco sintético efetivo contra TB. 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).

O mecanismo de ação da INH, bem como os meios de resistência ao fármaco desenvolvidos pelo bacilo, é complexo e pouco entendido. Evidências sugerem que esse fármaco inibe a biossíntese dos ácidos micólicos, que compõem a parede celular, tornando a bactéria suscetível aos radicais de oxigênio e a outros fatores do meio (ROSSETTI, et al., 2002).

Apesar da INH ser um fármaco importante na administração da tuberculose, as micobactérias não tuberculosas são, frequentemente, resistentes a esse medicamento. Segundo a literatura, divergências evolutivas entre o gene *KatG* das MNT e das micobactérias do complexo Mtb são as responsáveis pela resistência natural desenvolvida (REINGEWERTZ et al., 2019). Apesar de ser uma droga que pode ser utilizada e ter uma boa eficácia, a INH não é a primeira escolha no tratamento das principais cepas de MNT de interesse clínico.

Figura 5 – Estrutura Geral da Isoniazida



Fonte: Adaptado Pubchem (2019)



### 2.3.5 Aminoglicosídeos

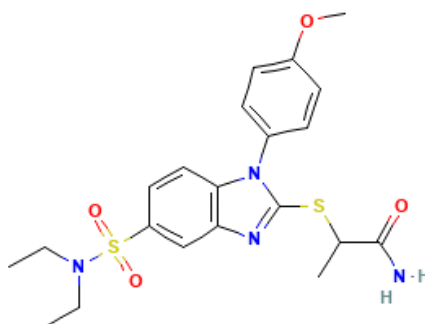
A família dos aminoglicosídeos são conhecidas pelo seu amplo espectro de antibióticos e pela sua potência frente a cepas. Essa classe vem sendo muito importante desde que a Streptomina foi isolada e utilizada pela primeira vez em 1944. Essa família já passou por várias gerações de fármacos que são utilizados nos mais variados tratamentos, a geração que teve um grande impacto no combate das cepas resistentes foi a terceira geração composta de: carbapenêmicos e cefalosporinas (NICOLAU et al, 1995)

Os aminoglicosídeos são utilizados contra vários organismos Gram negativos e Gram positivos. Possui uma boa resposta contra membros da família Enterobacter e contra o *Staphylococcus aureus*. Além disso, essa classe de fármacos possui uma boa resposta contra algumas cepas do gênero *Mycobacterium* incluindo o *M. tuberculosis* e algumas espécies de MNT, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. avium* (SWENSON et al. 1985; HO et al. 1997)

O mecanismo de ação aminoglicosídeos é a ligação na subunidade ribossômica 30S, levando à inibição da síntese proteica bacteriana. Esses fármacos têm um efeito dependente da concentração e sua toxicidade está associada à exposição cumulativa de drogas.

A amicacina (AMK), por exemplo, pode ser utilizada para infecções do complexo *M. avium* e *M. abscessus*. No entanto, riscos associados à incidência de toxicidade, toxicidade vestibular ou nefrotoxicidade são variáveis e possuem ligações com a quantidade necessária da droga a ser utilizada. O risco de toxicidade foi associado ao aumento da idade, maior duração do tratamento e maior dose cumulativa recebida (PELOQUIN et al., 2004).

Figura 6 – Estrutura Geral dos Aminoglicosídeos



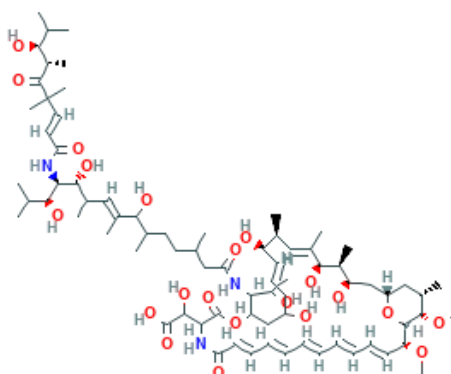
Fonte: Adaptado Pubchem (2019)

### 2.3.6 Macrolídeos

Em relação aos macrolídeos, dois fármacos são recomendados, principalmente, para o uso contra MNT, sendo eles a Azitromicina (AZI) e a Claritromicina (CLA). A Azitromicina, conhecido quimicamente como 9-deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerythromycin. Esse fármaco vem sendo utilizado nos casos em que houve falha no tratamento utilizando outras drogas, como a rifampicina e/ou a amicacina. Recentemente, esse fármaco foi amplamente utilizado como uma alternativa potencial no tratamento de casos de COVID-19. (BINDER et al., 2013; FERNANDES et al, 2021).

Como segundo representante temos a Claritromicina (6-O-methylerythromycin), que, assim como a azitromicina, também é utilizada quando ocorre falência terapêutica por fármacos de primeira linha (HAWORTH et al., 2017). Esses antibióticos possuem como mecanismo de ação a inibição da síntese do ribossomo 50S (DINOS, 2017). Além dessa similaridade no mecanismo de ação, em testes *in vitro* é possível observar que é o espectro de atividade para as cepas *M. avium*, *M. kansasii* e *M. abscessus* (VAN INGEN et al, 2012).

Figura 7 – Estrutura Geral dos Macrolídeos



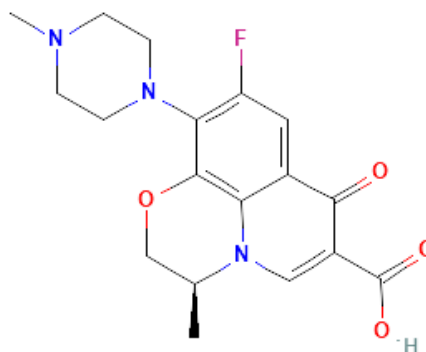
Fonte: Adaptado Pubchem (2019)

### 2.3.7 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas eventualmente desempenham um papel nos tratamentos da MNT. Essa classe de drogas é representada, principalmente, pela ciprofloxacina, moxifloxacina e levofloxacina, apresentando um efeito antibacteriano como mecanismo de ação, inibindo a DNA girase, que interrompe a síntese de DNA (DISRATTHAKIT; DOI, 2010).

A atividade desse grupo é dependente da concentração utilizada. A ciprofloxacina e a moxifloxacina têm atividade relatada na literatura contra o complexo *M. avium* e *M. intracellulare*, mas apresentam as melhores CIM contra o *M. intracellulare*. As fluoroquinolonas também têm alguma atividade contra outras espécies micobacterianas como *M. xenopi* e *M. kansasii*. No entanto, faltam estudos clínicos de farmacocinética para garantir sua eficácia contra outras espécies desse grupo (CHO et al., 2018).

Figura 8 – Estrutura Geral das Fluorquinolonas



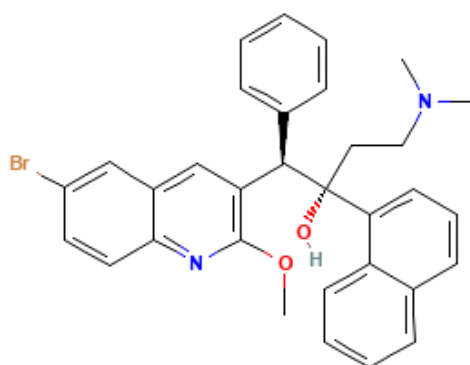
Fonte: Adaptado Pubchem (2019)

### 2.3.8 Bedaquilina

A bedaquilina faz parte da nova geração de drogas contra o gênero *Mycobacterium*. Essa molécula também conhecida como Diarylquinoline foi aprovada pela Food And Drugs Administration (FDA) em 2012 para o uso contra a tuberculose multidroga resistente. O desenvolvimento da bedaquilina iniciou-se a partir de uma análise *in silico* contra o *M. smegmatis* que possui características próxima do *M. tuberculosis* e pelo fator de crescimento rápido é útil na avaliação do potencial antimicobacteriano (COHEN, 2013).

Essa molécula foi escolhida entre mais de 70.000 compostos que foram testados contra o *M. smegmatis*, no entanto, a droga foi reformulada quimicamente para ser utilizada no tratamento da MDR-TB devido a características que foram apresentadas nos testes *in silico*. A bedaquilina também foi testada contra as cepas de MNT (SCHULTHESS et al, 2022), neste estudo foi observado o potencial dessa droga contra cepas de *M. abscessus* e *M. avium* desempenhando uma boa atividade.

Figura 9 – Estrutura Geral da Bedaquilina



Fonte: Adaptado Pubchem (2019)

## 2.4 Desenvolvimento de novas drogas

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 e micobactérias não tuberculosas (Quadro 2) é um processo que requer muito tempo além de ser muito oneroso e deve envolver duas abordagens distintas: seleção baseada em um único alvo ou seleção baseada em triagem fenotípica (KOUL et al., 2011).

Ensaio fenotípicos oferecem uma maior chance de descoberta de inibidores hits. Esta estratégia foi responsável por identificar os primeiros fármacos, bem com os as recentes classes de compostos sintéticos em diferentes estágios de ensaios clínicos: bedaquilina, delamanida, SQ109, TBA-7371 e pretomanida (CHETTY et al., 2017; COOPER, 2013).

Entretanto, transformar esses compostos em candidatos clínicos sofre de várias dificuldades sendo a principal a falta de conhecimento para identificar alvos específicos. Portanto, devido a tendência de gerar resultados falso-positivos em abordagens moleculares *in silico*, bem como às lacunas geradas em ensaios fenotípicos, é demonstrado a necessidade de pareamento de ambas as técnicas para o campo de descoberta e otimização de novos compostos para o gênero *Mycobacterium*. (GRZELAK et al., 2019).

Seguindo a proposta de erradicação da Tuberculose pela OMS que pretende erradicar a TB até 2050, em que novos fármacos podem ser repropostos para o enfrentamento das MNT. A abordagem é ambiciosa e pretende utilizar tecnologias mais eficazes (COSTA et al., 2016).

Quadro 2 - Pipeline de desenvolvimento de fármacos em ensaios clínicos

Classe	Fármaco	Alvo	Fase Clínica	Observações
<b>Diarilquinolina</b>	Bedaquilina	ATP Sintase	3	Aprovação condicional de comercialização
<b>Imidazopiridina amida</b>	Q203	ATP Sintase	1	Estudo de fase 1 de escalonamento de dose em andamento
<b>Nitroimidazol</b>	Delamanid	Inibir a síntese da parede celular	3	Aguardando aprovação condicional de comercialização
	Pretomanida	Inibir a respiração celular		Aguardando aprovação reguladora
<b>Oxazolidinona</b>	Sutezolidia	Síntese proteica no ribossomo 23s	2	Fase 1 concluída
	Delpazolida			Estudo de fase 2 de segurança e atividade bactericida precoce do fármaco
<b>1,2-etilenodiamina</b>	SQ109	Inibir a síntese da parede celular (MmpL3)	2	Ensaio foram interrompidos
	PBTZ169		3	
<b>Benzotiazinona</b>	OPC-167832	Inibidores DprE1	1	Codesenvolvido como fármaco complementar ao delamanid
	TBA-7371			
<b>Riminofenazina</b>	TBI-166	Membrana externa, cadeia respiratória bacteriana e transportadores de íons	1	Início da fase 1 na China em outubro de 2017
<b>Oxaborol</b>	GSK 070	Síntese proteica (leucil-RNAt sintetase)	1	Fase 1 concluída
	GSK 3036			

Fonte: Adaptado de Silva et al. (2018)

## 2.5 Novos agentes terapêuticos

A diidroesfingosina, ou (2S,3R)-2-aminooctadecano-1,3-diol) é o componente básico do anabolismo de esfingolipídios 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 cadeia longa engloba centenas de compostos designados como “bases esfingóides”, que possuem variações estruturais em: comprimento da cadeia; número, posição e estereoquímica de ligações duplas; grupos hidroxilas e outras funcionalidades. Estes compostos são encontrados em mamíferos, fungos, plantas, insetos, parasitas e organismo aquáticos e até então, eram considerados apenas como componentes estruturais das membranas celulares eucarióticas. (MCQUISTON; HALLER; DEL POETA, 2006)

A forma ativada da esfingosina (esfingosina 1-fostato ou 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 medicamentos que imitem essa sinalização poderia modular o sistema imunológico e assim, obter um efeito terapêutico considerável (MANDALA et al., 2002). 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., 2009; OLMO et al., 2016). Além disso, esses análogos apresentaram atividade anti-inflamatória e analgésica em modelos in vivo. (DE CAMPOS BUZZI et al., 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar e avaliar os compostos análogos a diidroesfingosina e podofilotoxinas como possível protótipo de droga contra micobacterias não tuberculosas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar o potencial antimicobacteriano *in vitro* dos compostos frente a cepas de *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. kansasii*;
- Avaliar a atividade citotóxica das substâncias em linhagens celulares de mamíferos;
- Determinar a interação farmacológica *in vitro* entre os compostos selecionados e os antimicrobianos utilizados no esquema terapêutico usual.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

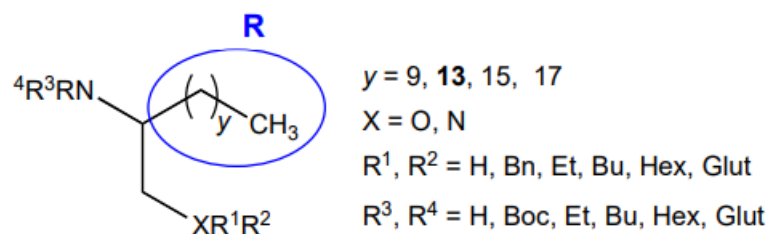
### 4.1 Síntese dos Compostos

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).

Foram sintetizados, analisados e caracterizados estruturalmente pelos Laboratórios do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca – USAL, sob a coordenação dos professores Dr. Arturo San Feliciano e Dra. Esther del Olmo e fornecidos ao Laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de imunologia do IAM/Fiocruz, através de cooperação internacional já oficialmente estabelecidas. Foram avaliado um total de quinze compostos derivados da classe diidroesfingosina e vinte e seis da classe podofilotoxina (NAIN-PÉREZ et al 2014).

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., 2009; LUCAS et al., 2000). Foram sintetizados quinze compostos com esqueletos de base da diidroesfingosina, como mostrado na quadro 2.

Figura 10 – Estrutura geral de diidroesfingosina



Fonte: o autor

Quadro 3 - Série de compostos do tipo diidroesfingosina otimizados e sintetizados.

<b>Amostra</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Peso Molecular</b>
0-12	C <sub>26</sub> H <sub>47</sub> NO	437
0-16	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO	277
A-3	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	384
A-4	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	412
A-1	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	384
A-5	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	440
C-3	C <sub>27</sub> H <sub>49</sub> NO	403
C-2	C <sub>23</sub> H <sub>41</sub> NO	347
D-15	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	440
D-09	C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> NO	313
D-07	C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> NO	285
C-1	C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> NO	257
0-11	C <sub>21</sub> H <sub>54</sub> NO	369
O-7	C <sub>25</sub> H <sub>45</sub> NO	375
O-12	C <sub>26</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>4</sub>	437

Fonte: O autor.

A síntese, caracterização e análise dos outros compostos também foram realizados, pelos Laboratórios do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca – USAL, sob a coordenação da professora Dra. Esther del Olmo. Foram avaliados um total de vinte e seis compostos derivados da classe podofilotoxina que já apresentaram atividade contra a *Leishmania* (MARTÍNEZ, 2015). As condições de reação e os processos químicos foram previamente estabelecidos e publicados na literatura científica (NAÍN-PÉREZ et al 2014). Os compostos foram divididos em duas classes, sendo a primeira a classe AFJ (Quadro 3) enquanto a segunda foi a classe OFJ (Quadro 4). A estrutura generalista dos compostos é apresentada na figura 11.

Quadro 4. Série de compostos do tipo podofilotoxinas otimizados e sintetizados.

<b>Amostra</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Peso Molecular</b>
AFJ-1	$C_{30}H_{54}N_2O_2$	474,77
AFJ-2	$C_{30}H_{52}N_2O_4$	501,76
AFJ-3	$C_{32}H_{52}N_2O_2$	496,78
AFJ-4	$C_{30}H_{52}H_2O_2$	506,77
AFJ-5	$C_{32}H_{57}N_3O_2$	515,83
AFJ-6	$C_{29}H_{52}N_2O_2$	492,75
AFJ-7	$C_{28}H_{50}N_2O_3$	462,72
AFJ-8	$C_{27}H_{49}N_3$	415,71
AFJ-9	$C_{25}H_{46}N_2O_2$	406,66
AFJ-10	$C_{29}H_{50}N_2O_4$	490,73
AFJ-11	$C_{28}H_{47}N_3O_5$	505,70
AFJ-12	$C_{27}H_{47}N_3O_3$	461,69
AFJ-13	$C_{31}H_{54}N_2O_6$	550,78
AFJ-14	$C_{28}H_{46}Cl_2N_2O_3$	529,59
AFJ-15	$C_{32}H_{50}N_2O_4$	526,76

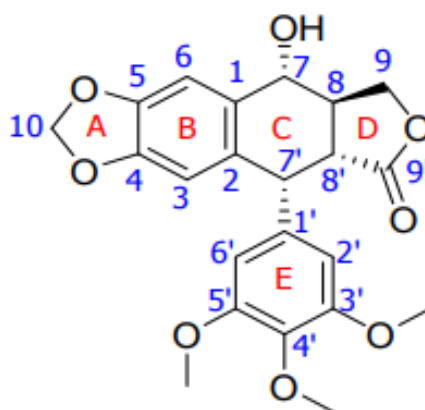
Fonte: o autor

Quadro 5. Série de compostos do tipo podofilotoxinas otimizados e sintetizados.

<b>Amostra</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Peso Molecular</b>
OFJ-1	$C_{28}H_{45}ClN_2O_6$	541,13
OFJ-2	$C_{28}H_{46}N_2O_6$	506,68
OFJ-3	$C_{27}H_{46}N_2O_4$	462,68
OFJ-4	$C_{32}H_{49}NO_5$	527,75
OFJ-5	$C_{29}H_{49}NO_5$	491,71
OFJ-6	$C_{30}H_{51}NO_6$	521,74
OFJ-7	$C_{30}H_{51}NO_6$	521,74
OFJ-8	$C_{30}H_{51}NO_6$	521,74
OFJ-9	$C_{31}H_{53}NO_7$	551,77
OFJ-10	$C_{30}H_{39}Cl_2N_3O_7$	624,56
OFJ-11	$C_{30}H_{39}Cl_2N_3O_7$	624,56

Fonte: o autor

Figura 11 – Estrutura geral das podofilotoxinas



Fonte: o autor

## 4.2 Testes Biológicos in vitro

### 4.2.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nesse estudo foram *M. avium* (ATCC 25291), *M. kansasii* (ATCC 12748) e *M. smegmatis* (ATCC 607) como cepas de referência da American Type Culture Collection.

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 as cepas de crescimento rápido (*M. smegmatis*) e 7 a 14 dias para as cepas de crescimento lento (*M. avium* e *M. kansasii*), 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 as de crescimento rápido e 14 a 21 dias para as de crescimento lento.

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.

### 4.2.2 Antimicrobianos de Referência

Como controle positivo de atividade antimicobacteriana, foram utilizados os antibióticos: etambutol, isoniazida, rifampicina, etionamida e amicacina (Sigma

Aldrich). Esses fármacos foram solubilizados em solventes indicados (água destilada estéril, dimetilsulfóxido (DMSO) ou Hidróxido de sódio (NaOH) e padronizados a uma solução estoque de 10 mg/mL.

#### 4.2.3 Determinação de atividade antimicobacteriana *in vitro*

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

Esse método proposto sofreu uma alteração com o objetivo de evitar a evaporação do caldo 7H9 e dos compostos, como foram utilizadas cepas com o tempo de crescimento diferentes, foi mantido essa alteração em todas as placas. Dessa forma, 200  $\mu$ L de água destilada foi adicionado nos poços do perímetro externo da microplaca. Posteriormente, foi depositado nos poços restantes 100  $\mu$ L 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  $\mu$ M a 2  $\mu$ M.

As culturas de *Mycobacterium*, em fase logarítmica de crescimento, foram transferidas 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, 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 nº01 de Mc Farland. Posteriormente, foi realizado uma diluição de 1:20 (v/v) e 100  $\mu$ L 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 com tempo variando para cada cepa utilizada. Após o período de incubação, 30  $\mu$ L 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 experimentos foram realizados em triplicata biológica.

#### 4.2.4 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) será realizado em placa de 96 poços de acordo com Mosmann (1983) e modificações. Serão utilizadas as linhagens J774A.1, correspondentes ao macrófago murino. Serão cultivadas em meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (estreptomicina – 100 µg/mL e penicilina 100 U/mL). O cultivo será mantido a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência celular.

As células serão recuperadas, ressuspendidas em meio apropriado e uma alíquota será quantificada com auxílio do azul de Tripán em câmara de Neubauer. Em seguida, será realizado o ajuste para que no semeio tenha 1 x 10<sup>5</sup> células por poço e incubadas por 24h nas mesmas condições iniciais de cultivo para permitir a adesão celular. Os compostos serão submetidos a diluição seriada (00 a 12,5 µM) em meio apropriado à linhagem celular e estas soluções serão transferidas para a placa contendo as células e reincubadas por mais 48h. Poços controle serão utilizados apenas com células e meio de cultura, bem como o controle do DMSO em meio (1% a 0,01%). O etambutol também será adicionado como controle negativo de citotoxicidade, por apresentar similaridade estrutural com os compostos avaliados.

Após 48h de exposição, será adicionado 25 µL da solução de MTT em PBS(5mg/mL). As placas serão reincubadas por três horas, protegida de luz direta, nas mesmas condições de ambiente e temperatura. Após esse período, o meio será aspirado, e 100 µL de DMSO será adicionado para dissolução dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT em células viáveis. A absorbância de cada poço será medida através do filtro de 540nm em leitor de placas. O valor de CC<sub>50</sub> será 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 serão realizados em triplicata.

Serão considerados como compostos promissores e selecionados para as etapas seguintes de avaliação, aqueles que apresentarem o índice de seletividade (SI) ≥ 10, conforme a equação 1, bem como uma CIM ≤ 10 µM. O cálculo de seletividade consiste na razão entre o valor de CC<sub>50</sub> obtidos para cada linhagem celular e a CIM dos compostos frente as cepas de micobactérias não tuberculosas. O

valor obtido permite inferir na seletividade do composto em inibir o microrganismo sem maiores danos à célula do hospedeiro (KATSUNO et al. 2015)

#### 4.2.5 Determinação da interação farmacológica *in vitro*

Será 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 serão utilizados como antibióticos de primeira linha; amicacina e levofloxacina como antibióticos de segunda linha. No eixo x da placa de 96 poços será 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 serão 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 *M. smegmatis* e *M. avium* serão ajustadas em  $1 \times 10^7$  UFC/mL e adicionadas em todos os poços. Serão reservados poços de controle decrescimento positivo do inóculo (meio 7H9 suplementado e bactéria) e controle de esterilidade do meio (apenas caldo 7H9 suplementado). As placas serão 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% será adicionada em todos os poços da microplaca. As placas serão novamente incubadas, a 37 °C por 48h. A mudança da coloração de azul para rosa (resazurina reduzida pela presença de viabilidade celular) indica o crescimento micobacteriano.

Os resultados serão interpretados pelo índice de concentração inibitória fracionado (FIC), em que 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  $\leq 0.50$  serão considerados como compostos sinérgicos;  $> 0.50$  a 4.0, indiferentes; e  $> 4$ , antagônicos. Resultados sinérgicos serão representados graficamente através de isobogramas (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2013).

### 4.3 Análise estatística

Os dados obtidos no modelo de infecção *in vitro* serão avaliados previamente quanto a abordagem paramétrica ou não paramétrica. Desta forma, as variáveis envolvidas no estudo serão testadas à posteriori quanto a homogeneidade dos dados utilizando o teste de Bartlett. Em seguida, será utilizado 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 RESULTADOS

### 5.1 Atividade antimicobacteriana

Foram sintetizados e avaliados 41 compostos para este estudo. Dentre esses, 15 são da família 1,2-alcano-diamina e 26 da família podofilotoxina. Utilizamos o *Mycobacterium smegmatis* (crescimento rápido), *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium kansasii* (crescimento lento) como microrganismo representativo das MNT.

No primeiro momento, as duas classes de compostos foram testadas contra o *M. smegmatis*, principalmente por ser uma cepa de crescimento rápido o que possibilita a obtenção mais rápida do espectro antimicobacteriana. Os compostos da classe 1,2-alcano-diamina apresentaram uma CIM variando entre 8 e >64  $\mu\text{M}$  (Quadro 6). Dentre estes, os compostos D-15 e A-1 apresentaram a melhor atividade com CIM de 8  $\mu\text{M}$ . Além destes, os compostos C-2 e O-12 apresentaram uma CIM de 16  $\mu\text{M}$ , enquanto os compostos O-16, A-3, A-4 e O-7 demonstraram uma CIM de 32  $\mu\text{M}$ . Os compostos restantes apresentaram uma CIM de 64 ou > 64  $\mu\text{M}$  sendo consideradas moléculas não promissoras para a continuidade dos outros testes *in vitro* (Quadro 6).

Observamos também, que os mesmos compostos apresentaram boa atividade frente ao *Mycobacterium avium*, os compostos D-15 e A-12 demonstraram a menor CIM de 8  $\mu\text{M}$ . Outros compostos como D-7, A-4, O-12, O-16, A-3, C-2, D15 e D-9 apresentaram uma CIM variando de 16 a 32  $\mu\text{M}$ . Os compostos restantes demonstraram uma fraca atividade com uma CIM variando de 64 a > 64  $\mu\text{M}$  (Quadro 6).

Por fim, analisamos os compostos frente ao *M. kansasii*, o composto O-12 demonstrou a menor atividade com uma CIM de 8  $\mu\text{M}$ . Os demais apresentaram uma CIM variando de 16 a > 64  $\mu\text{M}$  sendo o composto A-1 e D15 com 16  $\mu\text{M}$  e o A-4 com 32  $\mu\text{M}$ . O restante dos compostos demonstrou uma CIM de 64 ou > 64  $\mu\text{M}$ . Conseqüentemente, foram os compostos com menor atividade (Quadro 6).

Quadro 6. Atividade antimicobacteriana dos derivados do tipo diidroesfingosina frente a cepas de micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido e lento através da concentração inibitória mínima.

Compostos	CIM - µM		
	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	<i>M. kansasii</i> (ATCC 12748)
O-12	4	16	8
O-16	32	32	64
A-3	32	32	64
A-4	32	16	32
A-1	8	8	16
A-5	64	64	64
C-3	64	64	64
C-2	16	32	16
D-15	8	8	16
D-9	64	32	64
D-7	64	16	64
C-1	64	>64	64
O-11	64	>64	64
O-7	32	>64	64
RMP	16	16	16
INH	32	64	64
EMB	16	64	64
AMK	1	2	2
LVX	4	4	2

Fonte: o autor.

CIM: concentração inibitória mínima; RMP: Rifampicina; INH: Isoniazida; EMB: Etambutol; AMK: Amicacina; LVX: Levofloxacina;

A classe dos compostos derivados da podofilotoxina também foi testado frente as mesmas cepas. Essa classe foi dividida em AFJ e OFJ (Quadro 3 e 4), em que a diferenciação se dá pelo de carbono na cadeia dos derivados OFJ. A classe AFJ é composta por 15 compostos enquanto a classe OFJ de 11 compostos.

A classe AFJ apresentou atividade inibitória frente o *M. smegmatis*, *M. avium* e *M. kansasii*, com CIM variando de 2 a 64 uM para *Msm*, 4 a 64 uM para o *MAC* e 8 a 64 uM para *M. kansasii* (Quadro 7). Dentre estes compostos, o composto AFJ-6 apresentou a melhor atividade de 4 uM assim como os compostos AFJ-4 e AFJ-9 com CIM de 8.

Observamos, que os mesmos compostos apresentaram atividade contra a *M. avium* e *M.kansasii*. O composto AFJ-6 apresentou uma CIM de 4 e 8, respectivamente. AFJ-1 e AFJ-2 com uma CIM de 8 e 16 para as duas cepas. O restante dos compostos possui atividade baixa ou nula contra as três cepas testadas neste estudo. Com uma CIM variando de 64 a > 64 (Quadro 6).

Os compostos da classe OFJ também apresentaram atividade inibitória com CIM variando de 8 a >128 uM para *M. smegmatis* e *M. avium*, 16 a 64 uM para *M. kansasii*. Dentre estes compostos, o OFJ-2, OFJ-4 e OFJ-9 apresentou a melhor atividade com CIM de 8 uM para as cepas *M. smegmatis* e *M. avium* (Quadro 7). Outros compostos também apresentaram uma boa atividade como o OFJ-1 e OFJ-7 com uma CIM de 16 uM contra o *M.smegmatis* e 8 e 16 respectivamente contra o *M. avium*.

Quadro 7. Atividade antimicobacteriana dos derivados do podofilotoxina classe AFJ frente a cepas de micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido e lento através da concentração inibitória mínima.

Compostos	CIM - $\mu\text{M}$		
	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	<i>M. kansasii</i> (ATCC 12748)
AFJ-1	16	8	16
AFJ-2	8	8	16
AFJ-3	128	64	32
AFJ-4	8	8	64
AFJ-5	32	16	64
AFJ-6	4	8	64
AFJ-7	4	16	64
AFJ-8	16	32	16
AFJ-9	8	8	8
AFJ-10	>128	>128	4
AFJ-11	>128	>128	8
AFJ-12	64	128	64
AFJ-13	>128	>128	64
AFJ-14	128	>128	64
AFJ-15	>128	>128	64
RMP	16	16	16
INH	32	64	64
EMB	16	64	64
AMK	1	2	2
LVX	4	4	2

Fonte: o autor.

CIM: concentração inibitória mínima; RMP: Rifampicina; INH: Isoniazida; EMB: Etambutol; AMK: Amicacina; LVX: Levofloxacina;

Quadro 8. Atividade antimicobacteriana dos derivados do podofilotoxina classe OFJ frente a cepas de micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido e lento através da concentração inibitória mínima.

Compostos	CIM - $\mu\text{M}$		
	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	<i>M. kansasii</i> (ATCC 12748)
OFJ-1	>128	128	64
OFJ-2	64	32	64
OFJ-3	64	64	64
OFJ-4	32	32	64
OFJ-5	128	128	32
OFJ-6	64	16	32
OFJ-7	16	64	32
OFJ-8	64	64	32
OFJ-9	>128	128	16
OFJ-10	>128	>128	8
OFJ-11	>128	>128	8
RMP	16	16	16
INH	32	64	64
EMB	16	64	64
AMK	1	2	2
LVX	4	4	2

Fonte: o autor.

CIM: concentração inibitória mínima; RMP: Rifampicina; INH: Isoniazida; EMB: Etambutol; AMK: Amicacina; LVX: Levofloxacina;

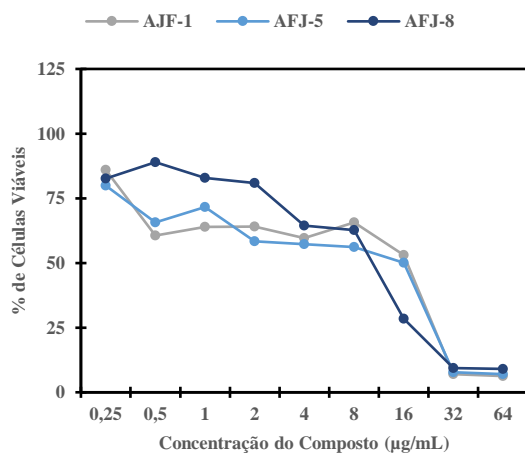
## 5.2 Atividade da citotoxicidade

A atividade da citotoxicidade (CC50) é uma etapa fundamental no desenvolvimento de novos compostos sendo fundamental. Sabe-se que o *Mycobacterium* é reproduzido intracelular nos macrófagos, dessa forma, utilizamos para análise da citotoxicidade a linhagem celular J774A.1 (macrófago de murinos).

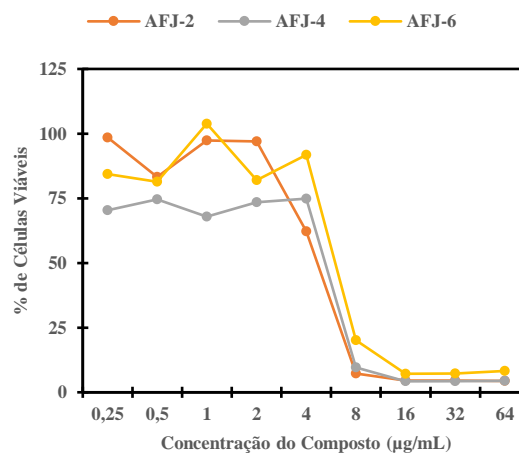
Como exposto nas figuras (12 e 13) podemos observar que os compostos da família podofilotoxina demonstram resultados de CC50 com concentrações próximas as melhores concentração apresentadas na CIM. Quando comparado com as concentrações capazes de inibir a atividade das cepas testadas *M. avium*, *M. kansasii* e *M. smegmatis* mantendo viabilidade celular entre 50%. Os compostos conseguiram manter mais de 50% de células viáveis e junto a um CIM satisfatório para cepa de *MAC* e *Msm* se tornam um candidato a continuação dos ensaios *in vitro*.

Figura 12. Citotoxicidade dos compostos AFJ em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50)

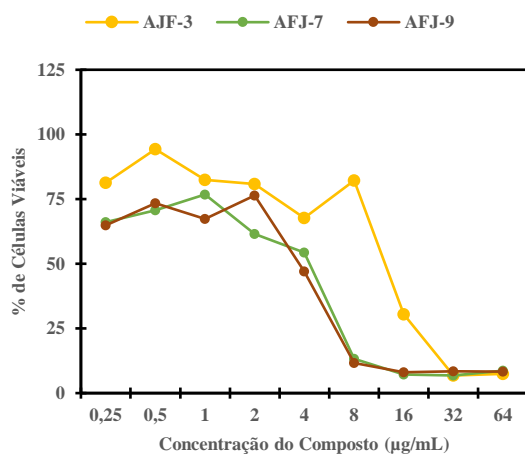
**A**



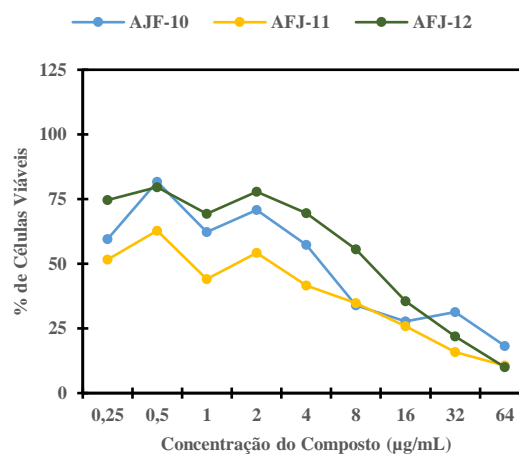
**B**



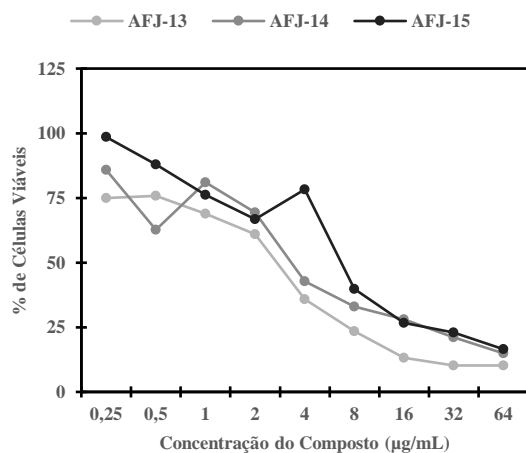
**C**



**D**



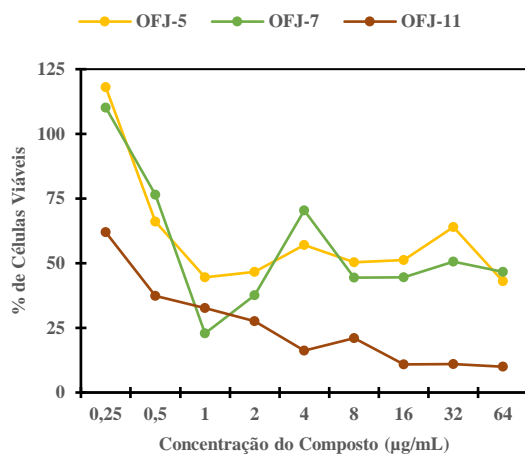
**E**



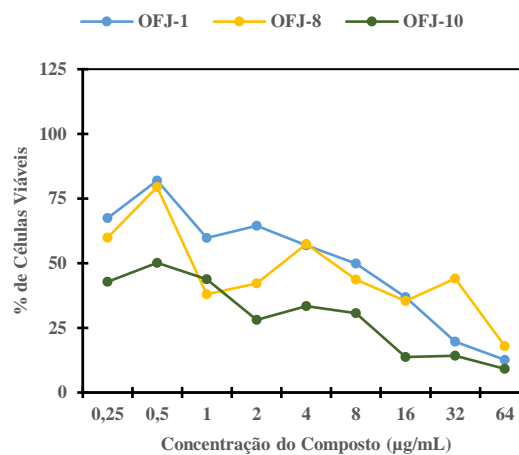
Legenda: CC50: concentração citotóxica para 50% da população celular;

Figura 13. Citotoxicidade dos compostos OFJ em linhagens de mamíferos expresso em valores de concentração citotóxica (CC50)

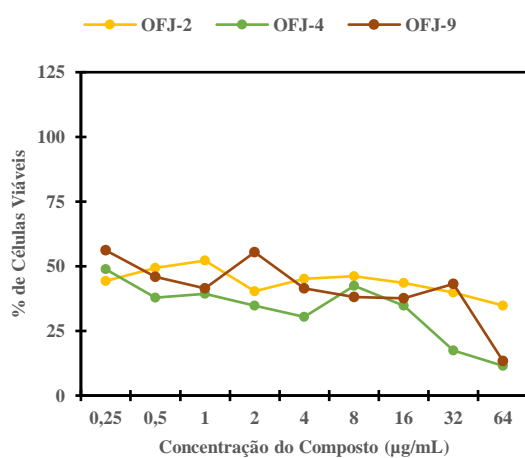
**A**



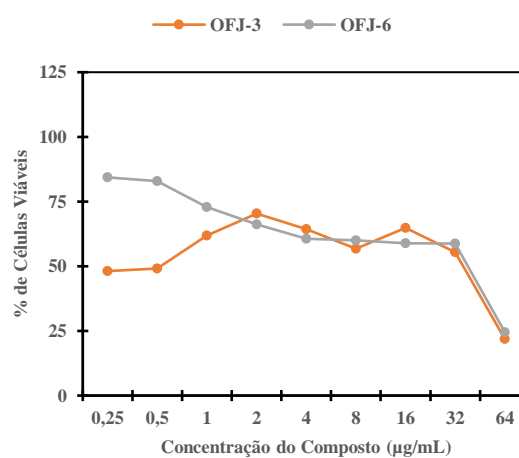
**B**



**C**



**D**



Fonte: o autor

Legenda: CC50: concentração citotóxica para 50% da população celular;



### 5.3 Avaliação da interação farmacológica *in vitro*

Buscando observar o tipo de interação farmacológica dos compostos sintetizados na presença de antimicrobianos de primeira linha e segunda linha, utilizamos o método checkerboard bidimensional em microplacas de 96 poços.

Foram selecionados os compostos que obtiveram uma CIM menor que 10  $\mu$ M e índice de CC50 igual ou próximo de 50 em linhagem celular macrofágica. Através do índice de concentração inibitória fracionada (FICI) foi possível determinar a interação entre as moléculas como sinérgica, aditiva ou antagônica. Utilizamos a RMP como droga de primeira linha e a AMK como representante da segunda linha.

Dos 5 compostos sintetizados nenhum apresentou efeito antagônico na inibição das cepas de *M. avium* e *M. smegmatis*. Os compostos apresentaram efeito indiferente variando de 1,031 a 2,620 para MAC (Quadro 9) e 1,06 a 2,56 para *Msm* (Quadro 10). Apesar de serem classes com potências antimicobacterianos. O resultado dessas interações terem sido indiferente na sua maioria significa que cada composto exerce atividade de forma independente, sem afetar o outro

Quadro 9. Concentração inibitória fracionada resultante da interação *in vitro* dos compostos selecionados e antimicobacterianos de primeira e segunda linha em cepa de *M. avium*

Compostos	Antimicobriano	<i>M. avium</i>			Efeito
		FIC ANT	FIC COM	FICI	
AFJ-6	RMP	0,97	0,07	1,072	Indiferente
	AMK	0,4	0,25	1,625	Indiferente
AFJ-2	RMP	0,97	0,13	1,134	Indiferente
	AMK	0,4	0,55	2,375	Indiferente
AFJ-12	RMP	0,97	0,29	1,299	Indiferente
	AMK	0,5	0,81	2,62	Indiferente
OFJ-2	RMP	0,97	0,78	1,804	Indiferente
	AMK	0,5	0,46	1,92	Indiferente
OFJ-3	RMP	0,97	0,03	1,031	Indiferente
	AMK	0,5	0,49	1,98	Indiferente

Fonte: o autor

Legenda: RMP: Rifampicina; AMK: Amicacina; FIC ANT: Concentração inibitória fracionada do antibiótico; FIC COM: Concentração inibitória fracionada do composto; FICI: Concentração inibitória fracionada do antibiótico somado a concentração inibitória fracionada do composto dividido pela concentração inibitória fracionada do antibiótico.

Quadro 10. Concentração inibitória fracionada resultante da interação *in vitro* dos compostos selecionados e antimicobacterianos de primeira e segunda linha em cepa de *M. smegmatis*

Compostos	Antimicobriano	<i>M. smegmatis</i>			Efeito
		FIC ANT	FIC COM	FICI	
AFJ-6	RMP	0,5	0,78	2,56	Indiferente
	AMK	1	0,5	1,5	Indiferente
AFJ-2	RMP	0,5	0,41	1,82	Indiferente
	AMK	1	0,21	1,21	Indiferente
AFJ-12	RMP	0,5	0,06	1,12	Indiferente
	AMK	1	0,07	1,14	Indiferente
OFJ-2	RMP	0,5	0,45	1,9	Indiferente
	AMK	1	0,74	1,74	Indiferente
OFJ-3	RMP	0,5	0,5	2	Indiferente
	AMK	1	0,06	1,06	Indiferente

Fonte: o autor

Legenda: RMP: Rifampicina; AMK: Amicacina; FIC ANT: Concentração inibitória fracionada do antibiótico; FIC COM: Concentração inibitória fracionada do composto; FICI: Concentração inibitória fracionada do antibiótico somado a concentração inibitória fracionada do composto dividido pela concentração inibitória fracionada do antibiótico.

## 6 DISCUSSÃO

As micobactérias não tuberculosas são reconhecidas como uma das fontes de infecções oportunistas mais alarmantes da atualidade, além disso, estão inseridas dentro de um cenário recente de pandemia de coronavírus (SARS-CoV-2), adicionando-se como mais uma problemática para os pacientes (ABUBAKAR et al, 2018). Atualmente, as MNT apresentam dificuldades do seu controle, entre elas: o diagnóstico que não é preciso e o tratamento sem eficácia garantida para as principais cepas oportunistas. Apesar das distinções dos vários agentes infecciosos, o preocupante aumento de casos de resistência no gênero *Mycobacterium*, bem como o limitado tratamento antimicobacteriano disponível, impulsionam a pesquisa por novos medicamentos e esquemas de tratamento (WHO, 2020).

Há uma necessidade da inserção de novas drogas no tratamento das doenças causadas pelo gênero *Mycobacterium sp.* Atualmente, a pesquisa clínica apresenta uma maior urgência de novos compostos com potencial terapêutico. A descoberta de novas moléculas promissoras é centrada predominantemente contra o *Mtb*, sobretudo por ser uma doença que, anualmente, causa 1,5 milhão de mortes no mundo (WHO, 2020). No entanto, durante o desenvolvimento de novos compostos, testes iniciais de atividade antimicobacteriana são realizadas contra cepas de MNT.

Dessa forma, novos compostos promissores também devem ser testados para outras espécies de micobactérias, para atuar como novas drogas que sejam úteis no combate dessas doenças (CAMPANIÇO, 2018). Uma das maiores dificuldades encontradas no desenvolvimento de novas drogas para MNT é a grande variedade morfológica entre as espécies. Características como crescimento rápido, lento e outras respostas, como a produção de biofilme tornam o processo mais oneroso. Além disso, a utilização de medicamentos voltadas para o tratamento da TB, e não especificamente para MNT afeta diretamente o desenvolvimento de novas drogas contra estas doenças.

Pesquisa, desenvolvimento e validação de novos fármacos para estas espécies de bactérias, se tornam complicados devido as particularidades das micobactérias. Devido a isto, nos últimos 20 anos, apenas um novo fármaco foi introduzido no esquema de tratamento da tuberculose (EGOROVA et al, 2021).

A maioria dos antibióticos disponíveis para o tratamento da MNT são de agentes reaproveitados de outras doenças. Dessa forma, a utilização dessas drogas, acabam sendo a única opção terapêutica, mantendo a realidade frustrante para o paciente e a equipe médica. Esses medicamentos possuem diversos efeitos colaterais, além disto estão associados a um baixo sucesso no tratamento, com taxa de cura de pouco mais acima de 50%, à sendo comparado neste quesito ao da Tuberculose Multidroga Resistente. (DALEY et al, 2020).

Devido a estas características, a procura de novos fármacos é desenvolvida por uma combinação de metodologias *in silico* e *in vitro*, com a proposta de encontrar novas moléculas com atividade antimicobacteriana. Sendo assim, entre as metodologias *in vitro*, algumas possuem um maior destaque, como a Concentração Inibitória Mínima, considerada um parâmetro fundamental na descoberta de novas moléculas, uma vez que pode indicar os compostos com um maior potencial antimicobacteriano. (COOPER, 2013). A utilização da CIM como parâmetro inicial é sustentada por outras pesquisas clínicas, como a Bedaquilina (TMC207), que sofreu uma otimização da sua estrutura após ser testada contra o *M. smegmatis* e depois modificada quimicamente para ser utilizada como uma droga para enfrentar o *Mtb* (COHEN, 2013). A presença de atividade frente à outras cepas de micobactérias foi documentada para alguns compostos que já possuem um composto em fase clínica de estudos, entre eles o SQ-109 e VACQUINOL (FENG et al., 2015).

Assim, neste estudo testamos a classe diidroesfingosina contra as MNT. Conforme proposto por Ramón-Garcia e colaboradores (2016), foi considerado que as moléculas que possuem CIM menor ou igual a 8  $\mu$ M apresentam atividade antimicobacteriana. Assim, o composto D15, A1 e O12 apresentaram atividade de (8  $\mu$ M) para *MsM* e *MAC*, (8  $\mu$ M) para *MsM* e *MAC* e (8  $\mu$ M) contra *Msm*, respectivamente. Dessa forma, as moléculas dessa classe apresentaram resultados considerados promissores no desenvolvimento de novas moléculas.

Cerca de 26 compostos inéditos da classe podofilotoxina foram sintetizados e testados contra cepas de MNT. Essa classe já teve sua atividade demonstrada na literatura contra a leishmania (MARTINEZ, 2015). Os compostos apresentaram atividade antimicobacteriano contra as cepas de *M. avium* e *M. kansasii*, que estão entre as principais infecções oportunistas do Brasil (DE SOUZA et al, 2020) e contra o *Msm* utilizada principalmente na triagem de novas moléculas contra o gênero

*Mycobacterium*. Dentre essas moléculas, os compostos AFJ-6 e AFJ-7 foram considerados promissores, ou seja, que satisfazem critérios mínimos predefinidos para viabilizar a futura otimização de estrutura e atividade (HEFTI, 2008). Além desses, os compostos AFJ-9, AFJ-4 e AFJ-2 apresentaram CIM de 8 para MsM e 8 para MAC, respectivamente. Dentro dessa classe, os compostos da classe OFJ apresentaram CIM variando de 16 a 128  $\mu$ M frente as mesmas cepas

Outro aspecto importante que é fundamental na busca de uma nova molécula é a citotoxicidade. Para este estudo utilizamos células macrofágicas do tipo J774A.1 (ATCC TIB-67). A linhagem celular J774A.1 é considerada fundamental em estudos de novas moléculas, principalmente contra o gênero *Mycobacterium sp.* (DE OLIVEIRA et al, 2021; ISLAM, et al, 2021). A avaliação da citotoxicidade é necessária para analisar a toxicidade de compostos a partir de uma análise preliminar (SOLCIA et al, 2021). Em relação a CC50, os compostos conseguiram manter a viabilidade celular nas concentrações de destaque apresentadas na Concentração Inibitória Mínima. Dentre os compostos que apresentaram os menores resultados na CIM (AFJ-2, AFJ-4, AFJ-6, AFJ-7 e AFJ-9), conseguimos observar que as concentrações foram mantidas uma viabilidade celular de até 50%. Assim, podemos observar que os compostos não apresentaram uma citotoxicidade elevada diferente dos outros resultados encontrados na literatura.

Gordaliza (2007) testou derivados da podofilotoxina e observou uma citotoxicidade mais elevada do que a obtida no presente estudo, levando a necessidade de realizar uma nova síntese dos compostos com modificações na sua estrutura. Entretanto Gordaliza, realizou o teste desses outros derivados como proposta de agente quimioterápico com outra linhagem celular, o que pode ter influenciado nos resultados divergentes. Shang (2012), realizou os testes de outros derivados da podofilotoxina no tratamento de infecções virais e encontrou resultados divergentes aos obtidos neste estudo. Cerca de 15 compostos apresentaram uma citotoxicidade elevada e apenas um composto foi capaz de manter a viabilidade celular na busca de um novo antiviral.

Os compostos derivados da classe diidroesfingosina não tiveram testes de CC50 realizados neste estudo devido à realização em um trabalho prévio (AQUINO et al, 2022), em que foi possível observar as melhores concentrações desses compostos frente a mesma linhagem celular. Neste outro estudo a ser publicado, os compostos

que obtiveram o melhor resultado foram os derivados O-12 e D-15 que também tiveram um bom desempenho na CIM contra as cepas de MNT.

Complementando os resultados obtidos, este estudo buscou avaliar a interação entre os compostos protótipos e antibiótico mais utilizados no tratamento para a maioria das espécies de MNT. Segundo Bolhuis e colaboradores (2014), investigar a sinergia entre os medicamentos usados atualmente no tratamento com novos fármacos pode ajudar a melhorar os regimes de tratamento vigentes (BOLHUIS et al, 2014). Assim, através do método checkerboard, observamos a capacidade da interação, sendo classificada como sinérgica, indiferente ou antagônica.

Os compostos testados apresentaram efeito indiferente quando utilizado junto as antimicobacterianos rifampicina e amicacina, frente a micobactérias não tuberculosas (*M. avium* e *M. smegmatis*), caracterizando assim que as combinações testadas não interagem sob nenhum aspecto de sua ação farmacodinâmica ou farmacocinética (YEW, 2002). O resultado da interação desses compostos contra os fármacos que são utilizados no tratamento é de extrema importância durante os estudos pré-clínicos, principalmente quando se trata de terapia que envolvem o *Mycobacterium* visto que os medicamentos do regime atual para esse gênero possuem inúmeros os relatos de falhas do tratamento quanto ao uso da monoterapia, seja para tuberculose ou para as micobactérias não tuberculosas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE; 2017).

Embora os dados apresentados nesse trabalho demonstrem o potencial das duas classes de moléculas testadas, novos estudos serão necessários para confirmar outras hipóteses referente ao potencial destas moléculas. Os compostos análogos a diidroesfingosina possuem potencial como protótipo contra a tuberculose multidroga resistente. Ainda assim, estes mesmos compostos apresentam atividade contra as micobactérias não tuberculosas.

Os derivados da podofilotoxina são reconhecidos como agentes anticancerígenos e antivirais, entretanto sabemos que a reposição de drogas é uma das alternativas que é praticado com frequência no campo da saúde. Estes compostos apresentaram atividade seguindo os parâmetros de um composto protótipo e desta forma, os resultados obtidos neste estudo, apesar de preliminares, fortalecem a hipótese de que estas moléculas são potenciais agentes para futuros ensaios *in vitro* como proposta farmacêutica contra as micobactérias não tuberculosas.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam a potencial atividade dos fármacos da família podofilotoxina contra cepas de micobactérias não tuberculosas e reafirmam o potencial da família de derivados da diidroesfingosina contra o *Mycobacterium sp*, dessa vez apresentando potencial contra outras cepas desse gênero. Dessa forma, os compostos podem ser considerados promissores do ponto antimicobacteriano por apresentarem:

- Presença da atividade inibitória das duas classes contra as cepas de micobactérias não tuberculosas de crescimento lento e rápido
- Os compostos testados demonstraram capacidade manter a viabilidade celular em linhagem macrofagica;
- Ausência de efeito antagônico e presença do efeito indiferente com fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento de cepas de micobactérias não tuberculosas.

Portanto, ajustes químico-estruturais podem ser realizados para potencializar melhores resultados. Os derivados relacionados à diidroesfingosina e podofilotoxina com maior ênfase para os compostos AFJ-6 e AFJ-2 expressaram desempenho inicial apropriado para continuidade ao processo de desenvolvimento de um composto protótipo para o tratamento das micobactérias não tuberculosas.

## REFERÊNCIAS

ABATE, Getahun et al. BCG vaccination induces *M. avium* and *M. abscessus* cross-protective immunity. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 234, 2019. ISSN: 16643224. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00234

ABUBAKAR, Ibrahim et al. Update in tuberculosis and nontuberculous mycobacteria 2017. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 197, n. 10, p. 1248-1253, 2018. ISSN: 1073449X. DOI: 10.1164/rccm.201801-0106UP

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.

AL HOUQANI, Mohammed et al. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario in 2007. **Canadian Respiratory Journal**, v. 18, n. 1, p. 19-24, 2011. ISSN: 19167245. DOI: 10.1155/2011/865831.

ALFFENAAR, Jan-Willem et al. Therapeutic drug monitoring in non-tuberculosis mycobacteria infections. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 60, n. 6, p. 711-725, 2021. ISSN: 11791926. DOI: 10.1007/s40262-021-01000-6.

ANES, Elsa et al. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. **Nature cell biology**, v. 5, n. 9, p. 793-802, 2003. ISSN: 14764679. DOI: 10.1038/ncb1036.

BASILLE, Damien; JOUNIEAUX, Vincent; ANDREJAK, Claire. Treatment of other nontuberculous mycobacteria. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, 2018. p. 377-382. ISSN: 10693424. DOI: 10.1055/s-0038-1660473.

BERTOLOZZI, Maria Rita et al. O controle da tuberculose: um desafio para a saúde pública. **Revista de medicina**, São Paulo, v. 93, n. 2, p. 83-89, 2014. DOI: 10.11606/issn.1679-9836.v93i2p83-89

BINDER, Alison M. et al. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 188, n. 7, p. 807-812, 2013. ISSN: 1073449X. DOI: 10.1164/rccm.201307-1200OC

BISAGLIA, Joana Buarque et al. Atualização terapêutica em tuberculose: principais efeitos adversos dos fármacos. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 11, n. 2, p. 53-59, 2003. ISSN: 0103460X. DOI:

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. 2008. ISBN: 9788533414471



BROWN-ELLIOTT, Barbara A.; NASH, Kevin A.; WALLACE JR, Richard J. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 545-582, 2012. ISSN: DOI: 10.1128/CMR.05030-11.

BRYANT, Josephine M. et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. **Science**, v. 354, n. 6313, p. 751-757, 2016. ISSN: 10959203. DOI: 10.1126/science.aaf8156.

CALEFFI-FERRACIOLI, Katiany R. et al. Fast detection of drug interaction in Mycobacterium tuberculosis by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660-663, 2013. ISSN: 14729792. DOI: 10.1016/j.tube.2013.09.001

CAMINERO, Jose A. et al. Proposal for a standardised treatment regimen to manage pre-and extensively drug-resistant tuberculosis cases. **European Respiratory Journal**, v. 50, n. 1, 2017. ISSN: 13993003. DOI: 10.1183/13993003.00648-2017

CAMPANIÇO, André; MOREIRA, Rui; LOPES, Francisca. Drug discovery in tuberculosis. New drug targets and antimycobacterial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 150, p. 525-545, 2018. ISSN: 02235234. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.020

CASTRO, M. A. et al. Chemoinduction of cytotoxic selectivity in Podophyllotoxin-related lignans. **Phytochemistry reviews**, v. 2, n. 3, p. 219-233, 2003. ISSN: 15687767. DOI: 10.1021/jm030978h

CHO, Eun Hye et al. Differences in drug susceptibility pattern between Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare isolated in respiratory specimens. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 4, p. 315-318, 2018. ISSN: 14377780. DOI: 10.1016/j.jiac.2017.10.022

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

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

COHEN, Jon. Approval of novel TB drug celebrated - With restraint. ScienceAmerican Association for the Advancement of Science, 2013. ISSN: 8010959203. DOI: 10.1126/science.339.6116.130.

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.

COWMAN, Steven; WILSON, Robert; LOEBINGER, Michael R. Opportunistic mycobacterial diseases. **Medicine**, v. 44, n. 6, p. 390-392, 2016. ISSN: 15365964. DOI: 10.1016/j.mpmed.2016.03.010

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017. ISSN: 20452322 DOI: 10.1038/srep42717

DALEY, Charles L. et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 4, p. e1-e36, 2020. ISSN: 10584838 DOI: 10.1093/cid/ciaa241

DE CAMPOS BUZZI, Fátima et al. New antinociceptive agents related to dihydrosphingosine. **Pharmacological reports**, v. 62, n. 5, p. 849-857, 2010. ISSN: 22995684. DOI: 10.1016/S1734-1140(10)70344-3

DE SOUZA, Adjanny Estela Santos et al. Ocorrência de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) em uma unidade de referência do estado do Pará, Brasil. **Saúde em Redes**, v. 6, n. 3, p. 39-48, 2020. ISSN: 24464813. DOI: 10.18310/2446-4813.2020v6n3p39-48

DE SOUZA, Marcus Vinícius Nora; VASCONCELOS, Thatyana Rocha Alves. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 678, 2005. ISSN: 16787064. DOI: 10.1590/S0100-40422005000400022

DINOS, George P. The macrolide antibiotic renaissance. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 18, p. 2967-2983, 2017. ISSN: 14765381. DOI: 10.1111/bph.13936

DISRATTHAKIT, Areeya; DOI, Norio. In vitro activities of DC-159a, a novel fluoroquinolone, against Mycobacterium species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2684-2686, 2010. ISSN: 10986596 DOI: 10.1128/AAC.01545-09

EGOROVA, Anna et al. Pipeline of anti-Mycobacterium abscessus small molecules: repurposable drugs and promising novel chemical entities. **Medicinal research reviews**, v. 41, n. 4, p. 2350-2387, 2021. ISSN: 1098-1128 DOI: 10.1002/med.21798

FALKINHAM III, Joseph O. Challenges of NTM drug development. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1613, 2018. ISSN: 1664302X. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01613

FENG, Xinxin et al. Anti infectives 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.

FERNANDES, Henry Marcel Zalona et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) treatment versus mycobacterial infections: Better safe than sorry?. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, p. 1-2, 2021 ISSN: 15596834. DOI: 10.1017/ice.2021.124

FLOSS, Heinz G.; YU, Tin-Wein. Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, p. 621-632, 2005. INSS: 15206890 DOI: 10.1021/cr030112j

FONTANA, Rosane Teresinha. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, p. 371-376, 2008. ISSN: 00347167. DOI: 10.1590/S0034-71672008000300016

FOX, Wallace; ELLARD, Gordon A.; MITCHISON, Denis 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**, v. 3, n. 10, p. S231-S279, 1999.

FRAUD, S. et al. Effects of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and chlorhexidine diacetate on Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus strains with modified permeability. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 575-584, 2003. ISSN: 14602091 DOI: 10.1093/jac/dkg099

GOPALASWAMY, Radha et al. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections—a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of biomedical science**, v. 27, n. 1, p. 1-17, 2020. ISSN: 14230127. DOI: 10.1186/s12929-020-00667-6

GORDALIZA, Marina. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, n. 12, p. 767-776, 2007. ISSN: 1699048X. DOI: 10.1007/s12094-007-0138-9

GRIFFITH, David E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007. ISSN: 1073449X. DOI: 10.1164/rccm.200604-571ST.

HAWORTH, Charles S. et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). **Thorax**, v. 72, n. Suppl 2, p. ii1-ii64, 2017. ISSN: 14683296. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2017-210927

HEFTI, Franz F. Requirements for a lead compound to become a clinical candidate. **BMC neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 1-7, 2008. ISSN: 14712202. DOI: 10.1186/1471-2202-9-S3-S7

HO, Y. I.; CHAN, C. Y.; CHENG, A. F. In-vitro activities of aminoglycoside-aminocyclitols against mycobacteria. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 27-32, 1997. ISSN: 14602091. DOI: 10.1093/jac/40.1.27

HOEFSLOOT, Wouter et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. **European Respiratory Journal**, v. 42, n. 6, p. 1604-1613, 2013. ISSN: 13993003. DOI: 10.1183/09031936.00149212

HONDA, Jennifer R. et al. Environmental nontuberculous mycobacteria in the Hawaiian Islands. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005068, 2016. ISSN: 19352735. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005068

HOSHINO, Yoshihiko; SUZUKI, Koichi. Differential diagnostic assays for discriminating mycobacteria, especially for nontuberculous mycobacteria: what does the future hold?. **Future Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 205-216, 2015. ISSN: 17460921. DOI: 10.2217/fmb.14.120

ISLAM, Md Imtiazul et al. Antimicrobial activity of IDD-B40 against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021. ISSN: 20452322. DOI: 10.1038/s41598-020-80227-y

JARAND, Julie et al. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 5, p. 565-571, 2011. ISSN: 15376591 DOI: 10.1093/cid/ciq237

JOHNSON, Margaret M.; ODELL, John A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Journal of thoracic disease**, v. 6, n. 3, p. 210, 2014. ISSN: 20721439. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24

KARIKAS, George A. et al. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. **J BUON**, v. 15, n. 4, p. 627-638, 2010. ISSN: 22416293. DOI: 10.5530/ajbls.2022.11.10

KATSUNO, Kei et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews drug discovery**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015. ISSN: 14741784. DOI: 10.1038/nrd4683

KHAWBUNG, Jessy Lallungawi; NATH, Durbba; CHAKRABORTY, Supriyo. Drug resistant tuberculosis: a review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 74, p. 101574, 2021. ISSN: 18781667. DOI: 10.1016/j.cimid.2020.101574.

KOLYVA, Anastasia S.; KARAKOUSIS, Petros C. Old and new TB drugs: mechanisms of action and resistance. **Understanding Tuberculosis-New approaches to fighting against drug resistance**, 2012. ISBN: 109533079487.

KONTTURI, Antti et al. Increase in childhood nontuberculous mycobacterial infections after Bacille Calmette-Guérin coverage drop: a nationwide, population-based retrospective study, Finland, 1995–2016. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 8, p. 1256-1261, 2018. ISSN: 15376591. DOI: 10.1093/cid/ciy241

LAI, C.-C. et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolates in elderly Taiwanese patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 779-783, 2011. ISSN: 14354373. DOI: 10.1007/s10096-011-1155-8

LAI, Chih-Cheng et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000–2008. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 294, 2010. ISSN: 10806040. DOI: 10.3201/eid1602.090675

LARSEN, E. M. et al. Ester-prodrugs of ethambutol control its antibacterial activity and provide rapid screening for mycobacterial hydrolase activity. **Bioorganic & medicinal**

**chemistry letters**, Oxford, v. 27, n. 19, p. 4544-4547, 2017. ISSN: 14643405. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.08.057

LEAO, Sylvia Cardoso et al. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. **Vanden Broele**, Brugges, Belgium, 2004. ISBN: 19789049618308.

LORIAN, Victor (Ed.). Antibiotics in laboratory medicine. **Lippincott Williams & Wilkins**, 2005. ISBN: 149630238.

LUCAS, R. et al. Synthesis and enzyme inhibitory activities of a series of lipidic diamine and aminoalcohol derivatives on cytosolic and secretory phospholipases. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 10, n. 3, p. 285–8, 7 fev. 2000. ISSN: 14643405. DOI: 10.1016/S0960-894X(99)00680-0

LYNCH, Kevin R.; MACDONALD, Timothy L. Sphingosine 1-phosphate chemical biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 9, p. 508-512, 2008. ISSN: 13881981. DOI: 10.1016/j.bbalip.2008.06.006.

MARRAS, Theodore K. et al. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. **Thorax**, v. 62, n. 8, p. 661-666, 2007. ISSN: 1468-3296. DOI: 10.1136/thx.2006.070797

MARTÍNEZ, José Miguel Escudero. **Actividad y modo de acción leishmanicida de nuevos derivados de la podofilotoxina y quinonas**. 2015. Tese de Doutorado. Universidad de León.

MCQUISTON, Travis J.; HALLER, Charles; DEL POETA, Maurizio. Sphingolipids as targets for microbial infections. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 671-680, 2006. ISSN: 18755607. DOI: 10.2174/138955706777435634

MOORE, Jonathan E. et al. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. **BMC public health**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2010. ISSN: 14712458. DOI: 10.1186/1471-2458-10-612

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. ISSN: 18727905. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NICOLAU, D. P. et al. Implementation of a once-daily aminoglycoside program in a large community-teaching hospital. **Hospital pharmacy**, v. 30, n. 8, p. 674-6, 679, 1995. ISSN: 0002-9289. DOI:

PALOMINO, Juan-Carlos et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002

PELOQUIN, Charles A. et al. Aminoglycoside toxicity: daily versus thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 11, p. 1538-1544, 2004. ISSN: 15376591. DOI: 10.1086/420742

RAMÓN-GARCÍA, Santiago et al. Repurposing clinically approved cephalosporins for tuberculosis therapy. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016. ISSN: 20452322. DOI: 10.1038/srep34293

RATNATUNGA, Champa N. et al. The rise of non-tuberculosis mycobacterial lung disease. **Frontiers in immunology**, p. 303, 2020. ISSN; 16643224. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00303

REINGEWERTZ, Tali H. et al. Differential sensitivity of mycobacteria to isoniazid is related to differences in KatG-mediated enzymatic activation of the drug. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. e01899-19, 2019. ISSN: 00664804. DOI: 10.1128/AAC.01899-19

ROSENBERG, Emiko Y.; MA, Dzwokai; NIKAIDO, Hiroshi. AcrD of Escherichia coli is an aminoglycoside efflux pump. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 6, p. 1754-1756, 2000. ISSN: 10985530. DOI: 10.1128/JB.182.6.1754-1756.2000

ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 525-532, 2002.

RUNYON, Ernest H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. 1959.

SCHITO, Marco; HANNA, Debra; ZUMLA, Alimuddin. Tuberculosis eradication versus control. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 10-13, 2017.

SCHULTHESS, Bettina et al. In Vitro Bedaquiline and Clofazimine Susceptibility Testing in Mycobacterium abscessus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. e02346-21, 2022.

SHANG, Hai et al. Synthesis and Biological Evaluation of 4 $\alpha$ /4 $\beta$ -Imidazolyl Podophyllotoxin Analogues as Antitumor Agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 345, n. 1, p. 43-48, 2012.

SHULHA, Jennifer A.; ESCALANTE, Patricio; WILSON, John W. Pharmacotherapy approaches in nontuberculous mycobacteria infections. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2019. p. 1567-1581.

SILVA, Denise Rossato et al. Novos fármacos e fármacos repropostos para o tratamento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 153-160, 2018.

SILVEIRA, Aletheia L. et al. Compound A398, a novel podophyllotoxin analogue: Cytotoxicity and induction of apoptosis in human leukemia cells. **PLOS one**, v. 9, n. 9, p. e107404, 2014.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo; GOMES, Andréia Patrícia. Antimicrobianos—Guia Prático 2010/2011. **Editora Rubio**, 2010.

SOINI, Hanna; MUSSER, James M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 809-814, 2001.

SOLCIA, Mariana Cristina et al. Growth-inhibitory effects of tris-(1, 10-phenanthroline) iron (II) against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo. **Tuberculosis**, v. 128, p. 102087, 2021.

SOMOSKOVI A, SALFINGER M. Nontuberculous mycobacteria in respiratory Infections: Advances in diagnosis and identification. **Clin Lab Med** [Internet].2014;34(2):271–95.

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**, v. 60, n. 2, p. 288-293, 2007.

TRAN, Anh C. et al. Detection of *Mycobacterium avium* complex DNA directly in clinical respiratory specimens: opportunities for improved turn-around time and cost savings. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 1, p. 43-48, 2014. ISSN: DOI:

VAN INGEN, Jakko et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease treatment. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 6, p. 559-565, 2012.

WINTHROP, Kevin L. et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 182, n. 7, p. 977-982, 2010.

WU, Mu-Lu et al. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug discovery today*, v. 23, n. 8, p. 1502-1519, 2018.

YEW, W. W. Clinically significant interactions with drugs used in the treatment of tuberculosis. **Drug safety**, v. 25, n. 2, p. 111-113, 2002.

ZHANG, Y. et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology spectrum*, v. 2, n. 4, p. MGM2-0023-2013, ago. 2014.

ZHANG, Ying et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 5, p. 790-795, 2003.

ZHANG, Ying et al. The catalase—peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, v. 358, n. 6387, p. 591, 1992. explains its clinical efficacy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Washington, v. 61, n. 9, p. e00924-17, 2017