

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

Danielle Martiniano da Silva Rodrigues

**Avaliação da atividade biológica *in vitro* de derivados de podofilotoxina contra  
cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e resistente**

Recife

2023

Danielle Martiniano da Silva Rodrigues

**Avaliação da atividade biológica *in vitro* de derivados de podofilotoxina contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e resistente**

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde 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.

Orientadora: Dra. Haiana Charifker Schindler

Coorientadora: Lílian Maria Lapa Montenegro

Recife

2023

Danielle Martiniano da Silva Rodrigues

**Avaliação da atividade biológica *in vitro* de derivados de podofilotoxina contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e resistente**

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde 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: 27 de outubro de 2023

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Haiana Charifker Schindler (Orientadora)  
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz-PE

---

Dra. Valéria Pereira Hernandez (Membro Interno)  
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz-PE

---

Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto (Membro Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

R696a Rodrigues, Danielle Martiniano da Silva.  
Avaliação da atividade biológica in vitro de derivados de podofilotoxina contra cepas de Mycobacterium tuberculosis sensível e resistente / Danielle Martiniano da Silva Rodrigues. -- 2023.  
52 p. : il.color.

Orientadora: Haiana Charifker Schindler.  
Coorientadora: Lílian Maria Lapa Montenegro.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, PE, 2023.  
Bibliografia: f. 49-52.

1. Tuberculose. 2. Resistência a Múltiplos Medicamentos. 3. Fármaco. 4. Podofilotoxina. 5. Antituberculosos. I. Título.

CDU 616.995.122

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

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todos que contribuíram de maneira significativa para a realização desta dissertação. O sucesso deste trabalho foi possível graças ao apoio, orientação e colaboração de diversas pessoas e instituições.

Primeiramente, quero agradecer a minha família, pelo apoio, incentivo e esforços para que eu pudesse alcançar tudo que tenho hoje.

Não poderia de forma alguma deixar de agradecer a meu amor e companheiro de vida. À Lucca, meu profundo agradecimento, por ser meu pilar e minha calma.

Quero expressar meu profundo agradecimento as minhas orientadoras, Haiana Charifker Schindler e Lílian Maria Lapa Montenegro, pela orientação perspicaz, paciência e dedicação ao longo deste processo. Suas orientações foram fundamentais para moldar e direcionar esta pesquisa.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, meu agradecimento pela disponibilização de recursos e infraestrutura que foram essenciais para a realização deste estudo. Agradeço também a todos os professores e pesquisadores que compartilharam seu conhecimento e experiência, enriquecendo meu percurso acadêmico.

Não posso deixar de mencionar meus amigos, cujo apoio foi crucial em todos os momentos. Seus estímulos, palavras de encorajamento e compreensão foram fundamentais para me manter motivada e determinada durante esta jornada.

A todos os participantes e colaboradores que gentilmente dedicaram seu tempo e conhecimento para contribuir com esta pesquisa, meu profundo agradecimento. Sem o envolvimento de vocês, este trabalho não teria alcançado seus objetivos.

Por fim, quero estender minha gratidão à comunidade acadêmica e a todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes, apoiando e inspirando meu crescimento como pesquisadora e indivíduo.

Este trabalho é uma celebração do esforço coletivo e das conexões que permeiam nossa jornada acadêmica e pessoal. A todos, o meu mais sincero obrigada.

## RESUMO

RODRIGUES, Danielle Martiniano da Silva. Avaliação da atividade biológica *in vitro* de derivados de podofilotoxina contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e resistente. 2023. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

A tuberculose é uma doença infecciosa e contagiosa datada desde meados do século XVII, mas que continua a ser uma preocupação global de saúde pública, sendo predominantemente causada pela espécie *Mycobacterium tuberculosis*. A resistência bacteriana aos fármacos de tratamento dificulta o controle da doença, exigindo a utilização de medicamentos mais tóxicos, prolongando o tempo de tratamento por até dois anos. Nesse cenário, novas estratégias se tornam urgentes no combate a doença. Pesquisas têm se concentrado na busca por novas moléculas com ação contra a bactéria e a podofilotoxina surge como uma candidata promissora para os testes *in vitro*. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade *in vitro* de derivados da podofilotoxina contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e multidroga resistente, visando sua potencial utilização no tratamento da tuberculose. Neste estudo, foram utilizadas duas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, sendo uma caracterizada como sensível aos medicamentos convencionais, que é a H37Rv e a cepa multidroga resistente (MDR-1576). Foram realizados testes *in vitro* utilizando quinze moléculas inéditas derivadas de podofilotoxina, sintetizadas e caracterizadas no laboratório de química da Universidade de Salamanca, na Espanha. Essas moléculas foram submetidas ao teste de concentração inibitória mínima em ambas as cepas, teste de concentração inibitória fracionada e avaliação da citotoxicidade, realizada em linhagem de macrófago murino J774A.1. Os resultados deste estudo indicam que seis dos quinze compostos testados apresentam atividade contra ambas as cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, os compostos selecionados para avaliação da interação farmacológica *in vitro* não apresentam qualquer interação significativa com os medicamentos do tratamento padrão da tuberculose, tornando possível o uso em conjunto. Entretanto, esses mesmos compostos apresentam níveis de citotoxicidade considerados preocupantes no desenvolvimento de novas moléculas farmacológicas. Portanto, mudanças na conformação química desses compostos, bem como novas estratégias no modelo de entrega da droga tornam-se necessárias, a fim de aumentar a afinidade contra o *Mycobacterium tuberculosis*, garantindo a segurança para as células hospedeiras. Essas descobertas sugerem que os derivados da podofilotoxina têm o potencial de se tornarem uma importante classe de medicamentos no combate à tuberculose.

Palavras-chave: tuberculose; resistência a múltiplos medicamentos; fármaco; podofilotoxina; antituberculosos.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Danielle Martiniano da Silva. Evaluation of the *in vitro* biological activity of podophyllotoxin derivatives against sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. 2023. Dissertation (Master's in Biosciences and Biotechnology in Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

Tuberculosis is an infectious and contagious disease dating back to the mid-17th century, but which continues to be a global public health concern, predominantly caused by the species *Mycobacterium tuberculosis*. Bacterial resistance to treatment drugs makes it difficult to control the disease, requiring the use of more toxic medications, prolonging treatment time for up to two years. In this scenario, new strategies become urgent to combat the disease. Research has focused on the search for new molecules with action against the bacteria and podophyllotoxin appears as a promising candidate for *in vitro* tests. Therefore, the present work aims to evaluate the *in vitro* activity of podophyllotoxin derivatives against sensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, aiming for their potential use in the treatment of tuberculosis. In this study, two strains of *Mycobacterium tuberculosis* were used, one characterized as sensitive to conventional medications, which is H37Rv, and the multidrug-resistant strain (MDR-1576). *In vitro* tests were carried out using fifteen new molecules derived from podophyllotoxin, synthesized and characterized in the chemistry laboratory of the University of Salamanca, in Spain. These molecules were subjected to the minimum inhibitory concentration test in both strains, fractional inhibitory concentration test and cytotoxicity assessment, carried out on murine macrophage lineage J774A.1. The results of this study indicate that six of the fifteen compounds tested show activity against both strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Furthermore, the compounds selected for evaluating pharmacological interactions *in vitro* do not show any significant interaction with standard tuberculosis treatment medications, making their use together possible. However, these same compounds present levels of cytotoxicity considered worrying in the development of new pharmacological molecules. Therefore, changes in the chemical conformation of these compounds, as well as new strategies in the drug delivery model, become necessary in order to increase affinity against *Mycobacterium tuberculosis*, ensuring safety for host cells. These findings suggest that podophyllotoxin derivatives have the potential to become an important class of drugs to combat tuberculosis.

Keywords: tuberculosis; multidrug resistance; drug; podophyllotoxin; antituberculous.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração do envelope celular com detalhes da conformação entre as macromoléculas constituintes da parede celular do <i>Mycobacterium</i> spp. ....	15
Figura 2 - Coeficiente de incidência (casos por 100 mil hab.) de tuberculose. Brasil, 2012 a 2022 .....	16
Figura 3 - Número de óbitos por tuberculose registrados no Brasil, 2011 a 2021.....	17
Figura 4 – Representação da estrutura química da Isoniazida .....	22
Figura 5 – Representação da estrutura química da Rifampicina.....	23
Figura 6 – Representação da estrutura química da Pirazinamida.....	24
Figura 7 – Representação da estrutura química do Etambutol .....	25
Figura 8 – Representação da estrutura química da molécula de Podofilotoxina.....	28
Figura 9 – Representação esquemática de placa para realização do FIC .....	35
Figura 10 – Citotoxicidade apresentada após tratamento com derivados de Podofilotoxina em linhagem celular de macrófagos murinos (J774A.1).....	39



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de compostos derivados de Podofilotoxina com seus respectivos pesos moleculares, sintetizados e caracterizados pelo laboratório de química da Universidade de Salamanca.....	31
Tabela 2 – Atividade <i>in vitro</i> dos compostos com base na concentração inibitória mínima em cepa sensível H37Rv; Citotoxicidade e Índice de Seletividade .....	37
Tabela 3 – Atividade <i>in vitro</i> dos compostos com base na concentração inibitória mínima em cepa MDR 1576; Citotoxicidade e Índice de Seletividade .....	38
Tabela 4 – Interação farmacológica de derivados de Podofilotoxina com fármacos do tratamento da Tuberculose frente a cepa sensível H37Rv.....	40
Tabela 5 – Interação farmacológica de derivados de Podofilotoxina com fármacos do tratamento da Tuberculose frente a cepa multidroga resistente.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMK	Amicacina
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CC <sub>50</sub>	Concentração que reduz cinquenta por cento da viabilidade celular
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMTB	Complexo Mycobacterium tuberculosis
EMB	Etambutol
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
KatG	Catalase-peroxidase
LV	Levofloxacina
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OADC	Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
SM	Estreptomicina
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Droga Resistente
WHO	World Health Organization
μM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO.....	14
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	15
2.3	TRANSMISSÃO.....	18
2.4	IMUNOPATOGENESE.....	19
2.5	TRATAMENTO.....	20
2.5.1	Tuberculose sensível.....	21
2.5.1.1	Isoniazida.....	21
2.5.1.2	Rifampicina.....	22
2.5.1.3	Pirazinamida.....	24
2.5.1.4	Etambutol.....	25
2.5.2	Tuberculose resistente.....	26
2.5.2.1	Fluoroquinolonas.....	27
2.5.2.2	Aminoglicosídeos.....	27
2.6	PODOFILOTOXINA.....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
<b>4</b>	<b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>31</b>
4.1	SÍNTESE E PREPARO DOS COMPOSTOS.....	31
4.2	MICROORGANISMOS E PREPARO DO INÓCULO.....	32
4.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	32
4.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	33
4.5	ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	34

4.6	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA.....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
5.1	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	37
5.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ÍNIDCE DE SELETIVIDADE...37	
5.3	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA.....	40
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em uma época remota, sem a luz da ciência, uma doença ocasionou milhares de mortes pelo mundo. De fácil transmissão e alta taxa de mortalidade, a Tuberculose (TB) rapidamente se espalhou. Não havia conhecimento sobre bactérias, menos ainda sobre antibióticos capazes de eliminá-las. Muitas teorias foram formadas sobre a praga que assolava a população, até que em 1882, um pesquisador chamado Robert Koch identificou um bacilo de aspecto ligeiramente curvo, responsável pela TB, no qual nomeou bacilo de Koch, em sua própria homenagem (DUCATI et al., 2006; KOCH, 1882).

Sendo causada majoritariamente pela espécie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é uma doença infectocontagiosa, classificada como uma emergência de saúde global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1993 (DUCATI et al., 2006). É considerada como uma das doenças infecciosas mais mortais do mundo e até o ano de 2020 era tida como a primeira causa de morte em decorrência de um único agente infeccioso, sendo ultrapassada apenas pela Covid-19 (Sars-CoV-2) (WHO, 2022).

Em 2021, estimou-se que aproximadamente 10,6 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com TB, resultando em 1,6 milhão de óbitos (WHO, 2022). É relevante observar que o Brasil está incluído entre os 30 países de alta carga da doença, considerados prioritários pela OMS para o controle da enfermidade. Nos últimos dez anos, cerca de 71 mil novos casos foram diagnosticados no país. Em 2022, estados brasileiros como Rio de Janeiro, Amazonas e Pernambuco se destacaram com taxas de mortalidade mais elevadas, registrando 5,0, 3,5 e 3,3 óbitos por 100 mil habitantes, respectivamente. Esses números ressaltam a necessidade contínua de esforços na gestão e tratamento da doença (BRASIL, 2023).

O diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais para a eficácia dos programas públicos de controle da doença, os quais buscam curar o paciente e evitar a transmissão do bacilo. Contudo, a não-adesão ao regime terapêutico é um importante fator de risco para o desenvolvimento da resistência bacteriana aos fármacos do tratamento. Os principais fatores atribuídos a não-adesão ao regime terapêutico estão diretamente relacionados aos efeitos adversos causados pelos medicamentos utilizados e ao longo tempo de exposição aos fármacos (DUCATI et al., 2006; HUF; KRITSKI, 2012).

A resistência bacteriana configura um grande desafio de saúde pública. Casos de TB resistente torna necessária a utilização de fármacos mais tóxicos, exigindo tratamento mais longo, que requer monitoramento clínico adicional, não sendo acessíveis ou disponíveis para a maioria dos pacientes, favorecendo a disseminação de cepas resistentes (SCHITO; HANNA; ZUMLA, 2017). Dessa forma, torna-se urgente o desenvolvimento de pesquisas atreladas a alternativas eficazes contra o Mtb, para retardar a evolução da resistência aos medicamentos, bem como melhorar o resultado do tratamento de pacientes infectados por cepas de TB resistente.

Apesar de diversos compostos estarem atualmente em fases avançadas de ensaios clínicos, ao longo das últimas cinco décadas, apenas dois fármacos foram introduzidos no mercado para o tratamento da TB: a Bedaquilina e o Pretomanid (OCCHINERI et al., 2022; OSBORNE, 2013). Nesse contexto, a podofilotoxina emerge como uma candidata promissora para testes *in vitro* na busca por novas moléculas com ação contra o Mtb. Originalmente extraída de plantas do gênero *Podophyllum*, principalmente das espécies *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi*, seu uso já foi relatado no tratamento de outras doenças infecciosas. Entretanto, essa substância revelou efeitos secundários indesejáveis, o que motivou a exploração de derivados ou análogos sintéticos menos tóxicos. Essas moléculas, desde então, têm servido como uma base estrutural para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (MEDRADO et al., 2014; SHAH et al., 2021).

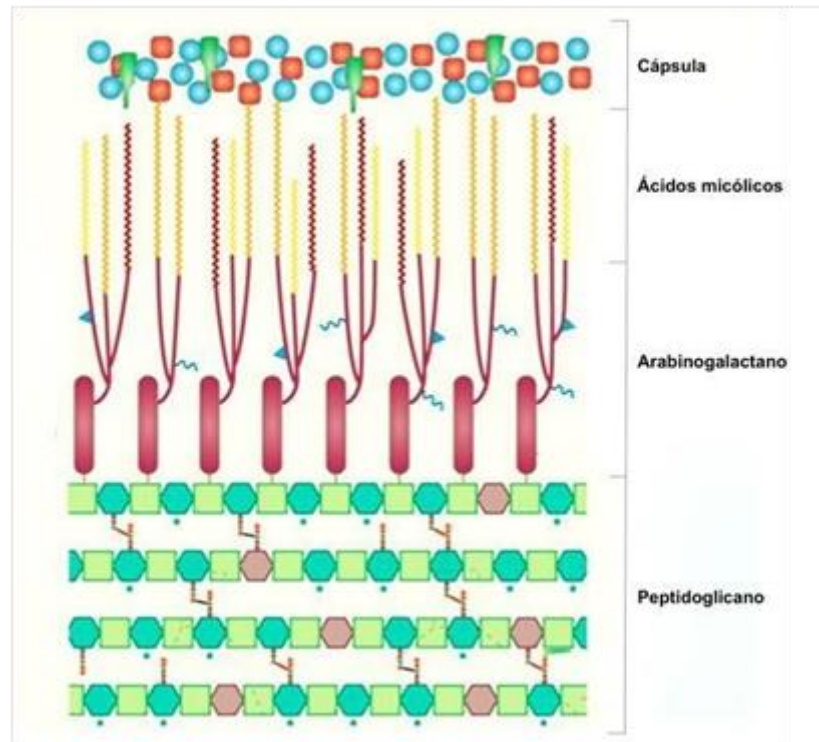
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

No âmbito da saúde pública, destaca-se a *Mycobacterium tuberculosis* como a espécie mais relevante, uma vez que é a principal agente causadora da TB em humanos. A descoberta e identificação dessa bactéria foi feita pelo médico e patologista Robert Koch em 1882 (KOCH, 1882). A Mtb é uma bactéria intracelular que habita preferencialmente os macrófagos, com uma morfologia ligeiramente curva e um tamanho que varia de 0,5 a 3  $\mu\text{m}$ . É categorizada como um Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR), caracterizada por sua natureza aeróbia estrita e uma parede celular rica em lipídios (BRASIL, 2019; ROSSMAN; MACGREGOR, 1995).

Um dos principais desafios no desenvolvimento de terapias eficazes contra a Mtb reside na complexidade de sua parede celular, que naturalmente confere resistência a diversos antibióticos e quimioterápicos. Esta parede celular é composta por três macromoléculas distintas - peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos - envoltas por uma cápsula externa de proteínas e polissacarídeos interligados de maneira não covalente (Figura 1). Essa barreira lipídica não apenas protege as bactérias da ação de enzimas do hospedeiro, mas também limita a permeabilidade a moléculas tóxicas e antibióticos, tornando os bacilos menos suscetíveis aos agentes terapêuticos disponíveis (KIESER; RUBIN, 2014; SINGH et al., 2018).

Figura 1 - Ilustração do envelope celular com detalhes da conformação entre as macromoléculas constituintes da parede celular do *Mycobacterium* spp.



Fonte: Ilustração adaptada de Kieser e Rubin, 2014.

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

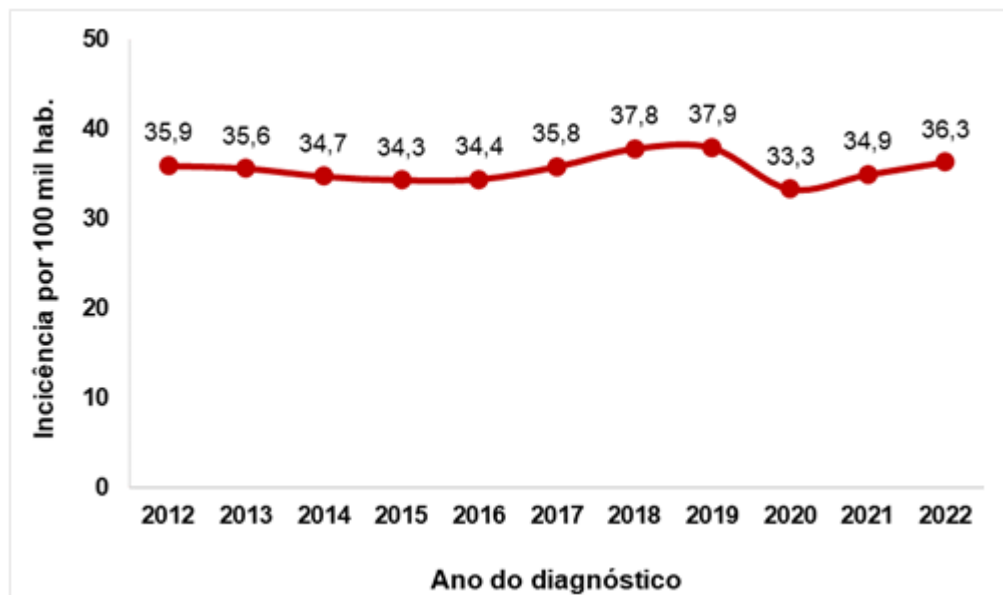
A história da TB remonta ao século XVII, sendo denominada de diversas maneiras ao longo do tempo, incluindo tísica e peste branca (DUCATI et al., 2006). Esta doença causou óbitos principalmente no continente europeu, mas foi durante a Revolução Industrial que houve um aumento substancial nos casos, relacionado ao crescimento populacional e às condições de vida desfavoráveis, transformando-a em uma epidemia. No Brasil, há evidências de que a TB tenha sido introduzida por missionários portugueses e jesuítas desde 1500, persistindo até os dias atuais como a principal causa de morte em decorrência de um único agente infeccioso (BAÑULS et al., 2015).



A introdução da vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin) em 1921 marcou um declínio considerável na incidência da doença. Além disso, antibióticos como estreptomicina (SM), isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) foram gradualmente introduzidos nos anos seguintes. No entanto, a partir de 1980, a incidência da TB voltou a aumentar, devido principalmente à emergência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Esse aumento no número de casos também foi associado ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos, tornando o controle dessa doença ainda mais desafiador (BAÑULS et al., 2015; DUCATI et al., 2006).

A nível global, a TB ainda é uma das doenças infecciosas mais prevalentes. De acordo com os últimos dados divulgados, em 2021 cerca de 10,6 milhões de novos casos foram registrados, com aproximadamente 1,5 milhão de óbitos relacionados à doença (WHO, 2022). Atualmente o Brasil está entre os 30 países de alta carga para TB considerados prioritários pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o controle da doença. Apenas no ano de 2022, foram registrados 78.057 novos casos da doença no país, com um coeficiente de incidência de 36,3 por 100 mil habitantes, dos quais 4.531 foram a óbito (Figura 2) (BRASIL, 2023).

Figura 2 - Coeficiente de incidência (casos por 100 mil hab.) de tuberculose. Brasil, 2012 a 2022

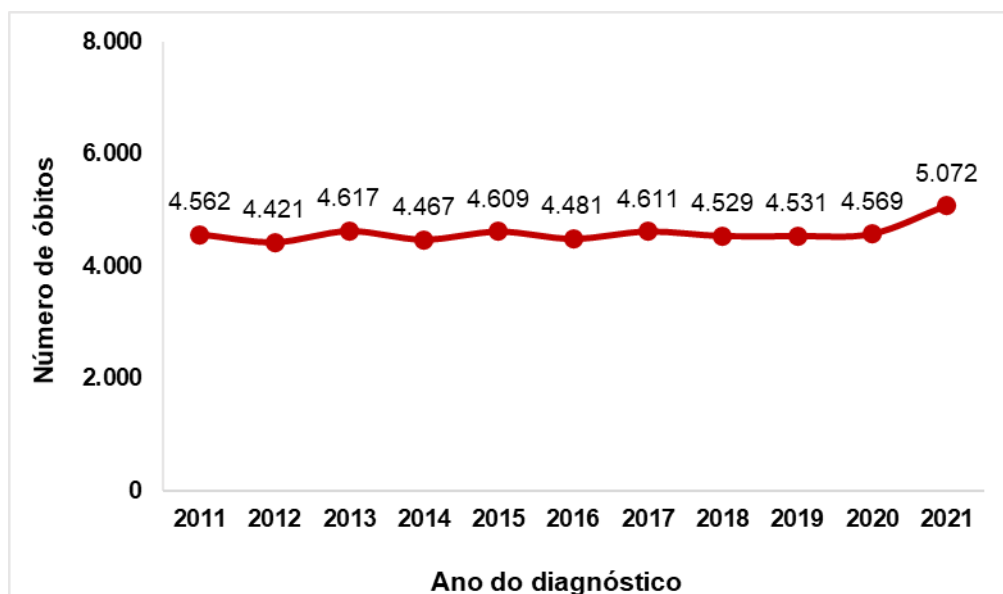


Fonte: Adaptado do Boletim Epidemiológico, 2023.

O menor registro de incidência de casos de TB nos últimos dez anos coincide com o surgimento da pandemia de Covid-19 no Brasil. Assim como em outros países, o sistema de saúde brasileiro foi significativamente impactado pela pandemia, resultando em uma subnotificação de casos de TB e uma falsa impressão de redução na incidência da doença. De acordo com estimativas globais, no primeiro ano da pandemia, cerca de 10,1 milhões de pessoas em todo o mundo desenvolveram a TB. No entanto, apenas 5,8 milhões desses casos (equivalente a 57,4%) foram devidamente diagnosticados e notificados. Isso representa uma redução de 18% em comparação a 2019, quando os países notificaram 7,1 milhões de casos dos 10 milhões estimados (equivalente a 71%) (BRASIL, 2023).

No Brasil, durante aproximadamente duas décadas, observou-se uma redução, ainda que gradual, no coeficiente de mortalidade por tuberculose. No entanto, em 2021, essa tendência se inverteu, com o registro de 5.072 óbitos, resultando em um coeficiente de 2,38 óbitos por tuberculose para cada 100 mil habitantes (Figura 3). Em comparação com o ano de 2019, houve um aumento relativo de 10,7% no coeficiente de mortalidade e um aumento de 11,9% no número total de óbitos por tuberculose. É importante ressaltar que a última vez em que o país registrou um número de óbitos por tuberculose superior a 5 mil foi em 2002 (BRASIL, 2023).

Figura 3 - Número de óbitos por tuberculose registrados no Brasil, 2011 a 2021



Adaptado do Boletim Epidemiológico, 2023.

## 2.3 TRANSMISSÃO

A principal via de transmissão da TB é através do ar, ocorrendo quando indivíduos bacilíferos eliminam gotículas contaminadas no ambiente por meio da fala, tosse ou espirro. O termo "bacilífero" refere-se a pessoas acometidas pela TB pulmonar ou laríngea, que apresentam resultado positivo na baciloscopia do escarro. Essas gotículas liberadas são conhecidas como gotículas de Pflüger, que, ao serem exaladas, rapidamente se tornam secas e se transformam em partículas menores chamadas núcleos de Wells. Estes núcleos contêm os bacilos da TB e podem permanecer suspensos no ar por várias horas, até que sejam inalados por outra pessoa. Isso pode permitir que os bacilos alcancem os alvéolos pulmonares, onde podem se multiplicar e causar a chamada primo-infecção (CHURCHYARD et al., 2017; RIEDER, 1999).

Outras vias de infecção, como a transmissão através da pele ou placenta, são raras e, portanto, têm pouca relevância epidemiológica na propagação da doença. Além disso, crianças com TB pulmonar geralmente apresentam resultado negativo na baciloscopia, o que também as torna pouco importantes na cadeia de transmissão (RIEDER, 1999). Para reduzir o risco de transmissão, medidas simples podem ser adotadas, como o uso de máscaras e a manutenção da higiene pessoal por parte de pessoas com TB ativa que estejam apresentando baciloscopia positiva. Além disso, devido à alta sensibilidade dos bacilos à luz solar, uma boa circulação de ar pode ajudar na dispersão dos bacilos e, conseqüentemente, na redução do risco de transmissão (BRASIL, 2019; CHURCHYARD et al., 2017).

## 2.4 IMUNOPATOGÊNESE

A TB pode afetar diferentes órgãos e sistemas do corpo, com manifestações predominantemente pulmonares, representando cerca de 80% dos casos mundiais. O processo começa com a inalação de gotículas respiratórias contendo o Mtb, que é fagocitado pelos macrófagos alveolares nos pulmões. Durante esta fase inicial, o sistema imunológico desencadeia uma resposta imune inata, envolvendo células como neutrófilos e macrófagos, na tentativa de conter a infecção. Em muitos casos, essa resposta impede que a infecção se dissemine, levando à formação de estruturas chamadas granulomas. Esses granulomas consistem em uma organização complexa de células, incluindo macrófagos ativados, células T, células B e outros leucócitos. Eles servem como barreira física para isolar o Mtb e evitar sua disseminação pelo corpo (BRASIL, 2019; COURA, 2013).

A resposta celular é fundamental na imunopatogênese da TB e as células T CD4+ desempenham um papel crucial. Essas células reconhecem antígenos do Mtb apresentados por células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, e secretam citocinas que ativam os macrófagos para destruir as bactérias. As células T CD8+ também desempenham um papel importante na eliminação das células infectadas pelo Mtb. Ao longo do tempo, o sistema imunológico desenvolve uma resposta imune adaptativa eficaz contra a bactéria, levando a uma infecção latente, na qual o Mtb permanece contido nos granulomas sem causar sintomas. Indivíduos com TB latente não desempenham um papel direto na transmissão da doença. Entretanto, em alguns cenários, o Mtb consegue evitar a resposta imune eficaz, levando à persistência da infecção (DUCATI et al., 2006; ROSEMBERG, 2001).

Além disso, em alguns casos, a infecção latente pode evoluir para uma forma ativa da doença. Estima-se que essa progressão ocorra em 5% a 10% das pessoas com TB latente. A reativação geralmente ocorre quando o sistema imunológico é comprometido, como em casos de infecção por HIV, uso de medicamentos imunossupressores ou outras condições que enfraquecem a imunidade. Isso resulta na destruição dos granulomas e na disseminação das bactérias, causando danos aos tecidos afetados, como os pulmões. Essa resposta inflamatória excessiva pode resultar em sintomas clínicos, como tosse, febre e dificuldade respiratória (CRUZ-KNIGHT; BLAKE-GUMBS, 2013; FLOSS; YU, 2005).

## 2.5 TRATAMENTO

De acordo com a OMS, a TB é uma doença curável em praticamente todos os casos, em pessoas com bacilos sensíveis aos medicamentos antituberculose (anti-TB), desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e que haja a adequada operacionalização do tratamento. O tratamento tanto da forma sensível quanto da resistente, envolve a administração de múltiplos antibióticos ao longo de um período prolongado. A escolha dos medicamentos e a duração do tratamento variam dependendo do tipo de TB e da resistência aos medicamentos (BRASIL, 2019).

Em ambos os casos, a adesão estrita ao tratamento é crucial para evitar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e garantir a cura. Além disso, a gestão dos efeitos colaterais e o acompanhamento médico regular são fundamentais para o sucesso do tratamento da doença. A escolha dos medicamentos e a duração do tratamento podem variar com base nas diretrizes locais e nas características individuais do paciente. Portanto, é importante que o tratamento seja supervisionado por profissionais de saúde especializados no tratamento da TB (BRASIL, 2019).

Levando-se em consideração o comportamento metabólico e a localização do bacilo, o atual esquema terapêutico visa atender a três principais objetivos: ter atividade bactericida precoce; ser capaz de prevenir a emergência de bacilos resistentes e ter atividade esterilizante. A atividade bactericida precoce é a capacidade de eliminar o maior número de bacilos o mais rápido possível. Para a prevenção da seleção de bacilos resistentes é necessária a associação de diferentes fármacos, que agirão sobre os bacilos sensíveis e naturalmente resistentes, uma vez que bacilos resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro. A atividade esterilizante é a capacidade de eliminar todos os bacilos presentes no indivíduo, impedindo o reaparecimento da TB após o tratamento (BRASIL, 2019; COURA, 2013).

### 2.5.1 Tuberculose sensível

Introduzida na década de 1950, a INH é um dos principais medicamentos usados no tratamento da TB (ZHANG et al., 1992). Possui estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida (Figura 4). É um pró-fármaco que é ativado apenas ao adentrar os bacilos, através de difusão passiva. A forma tóxica é ativada pela enzima catalase-peroxidase, codificada pelo gene KatG do *M. tuberculosis*, produzindo radicais reativos de oxigênio e radicais orgânicos, que inibem a formação de ácidos micólicos da parede celular, causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo (ARBEX et al., 2010).

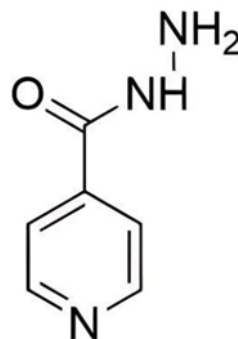
Os mecanismos de resistência à isoniazida podem estar associados a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam para catalase-peroxidase (katG), que diminuem sua atividade, impedindo a ativação do fármaco (ROSSETTI et al., 2002). Apesar de ser um importante agente para o tratamento da tuberculose, alguns efeitos adversos podem ser relatados, desde náuseas e alterações de comportamentos até os mais graves, embora raros, como: neuropatia periférica, dano hepático assintomático e falência do órgão (ARBEX et al., 2010; BISAGLIA et al., 2003).

#### 2.5.1.1 Isoniazida

Introduzida na década de 1950, a INH é um dos principais medicamentos usados no tratamento da TB (ZHANG et al., 1992). Possui estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida (Figura 4). É um pró-fármaco que é ativado apenas ao adentrar os bacilos, através de difusão passiva. A forma tóxica é ativada pela enzima catalase-peroxidase, codificada pelo gene KatG do *M. tuberculosis*, produzindo radicais reativos de oxigênio e radicais orgânicos, que inibem a formação de ácidos micólicos da parede celular, causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo (ARBEX et al., 2010).

Os mecanismos de resistência à isoniazida podem estar associados a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam para catalase-peroxidase (katG), que diminuem sua atividade, impedindo a ativação do fármaco (ROSSETTI et al., 2002). Apesar de ser um importante agente para o tratamento da tuberculose, alguns efeitos adversos podem ser relatados, desde náuseas e alterações de comportamentos até os mais graves, embora raros, como: neuropatia periférica, dano hepático assintomático e falência do órgão (ARBEX et al., 2010; BISAGLIA et al., 2003).

Figura 4 – Representação da estrutura química da Isoniazida



Fonte: Adaptado do Pubchem, 2023.

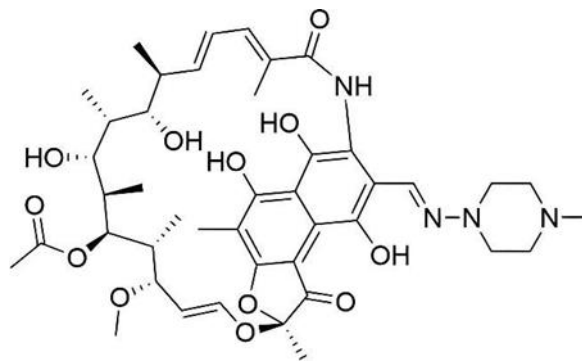
#### 2.5.1.2 Rifampicina

Introduzida na década de 1960, a RMP é um dos antibióticos mais essenciais e eficazes no tratamento da TB na atualidade (Figura 5). Com a sua introdução no esquema terapêutico da TB, o tempo de tratamento foi reduzido de 18 para 9 meses, o que representou um avanço notável no combate à doença (ABULFATHI et al., 2019; AHMAD; MAKAYA; GROSSET, 2011). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da transcrição gênica da micobactéria, ao ligar-se à subunidade beta da RNA polimerase, a RMP impede que a enzima sintetize novas moléculas de RNA, interrompendo assim a síntese proteica e comprometendo a sobrevivência bacteriana (PELOQUIN; DAVIES, 2021).

Esse fármaco demonstra um notável poder bactericida, caracterizando-se por sua alta capacidade de esterilização das lesões causadas pelo Mtb, tanto nos estágios metabólicos ativos quanto em estados de latência (LIU; WANG; TANG, 2020). Contudo, é importante ressaltar que o mecanismo de resistência a esse medicamento já é amplamente conhecido, resultando principalmente de mutações dos genes que codificam a RNA polimerase, especialmente a subunidade beta. Essas mutações podem alterar a estrutura da enzima, tornando-a menos sensível à ação do fármaco. (ARBEX et al., 2010; PELOQUIN; DAVIES, 2021).

Apesar de sua eficácia notável, a utilização desse fármaco pode acarretar alguns efeitos adversos. Entre eles, os mais comuns são: reações cutâneas, intolerância gastrointestinal e hepatotoxicidade. A Rifampicina tem sido combinada com outros medicamentos inovadores no desenvolvimento de novas terapias contra a TB, visando melhorar a eficácia do tratamento, reduzir a duração da terapia e combater a resistência bacteriana. Dentre esses combinados, destacam-se aqueles que envolvem novos medicamentos como a Bedaquilina e a Delamanida (LIU; WANG; TANG, 2020).

Figura 5 – Representação da estrutura química da Rifampicina



Fonte: Adaptado do Pubchem, 2023.



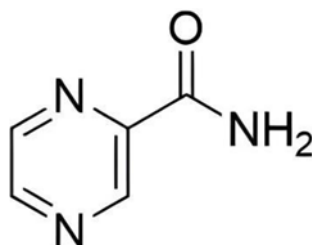
### 2.5.1.3 Pirazinamida

A pirazinamida é um análogo estrutural da nicotinamida, com estrutura molecular semelhante a isoniazida (Figura 6), mas sem resistência cruzada. Foi descoberta em 1936, porém adicionada ao esquema terapêutico apenas em 1970, levando a uma redução no tempo de tratamento de nove para seis meses. Assim como a isoniazida, também necessita ser ativada para exercer seu efeito (ROSSETTI et al., 2002; ZHANG et al., 1992). É um fármaco bactericida, com potente ação esterilizante, principalmente em meio ácido no interior dos macrófagos e em áreas de inflamação aguda (ARBEX et al., 2010).

Seu mecanismo de ação consiste na penetração no Mtb através de difusão passiva, necessitando ser ativada ou convertida pela ação da enzima bacteriana pirazinamidase (PZase) para sua forma ativa, o ácido pirazinóico. O acúmulo de ácido pirazinóico diminui o pH intracelular inativando enzimas, como a ácido graxo sintase I, fundamental para a síntese dos ácidos graxos e, em consequência, impedindo a biossíntese do ácido micólico da parede celular bacteriana, induzindo a morte do bacilo (ARBEX et al., 2010).

O mecanismo de resistência a esse fármaco está ligado a mutações no gene codificador da PZase, o *pncA*, diminuindo a atividade da enzima. No entanto existem outros mecanismos de resistência relacionados com a permeabilidade da PZA através da regulação do *pncA* ou do efluxo do ácido pirazinóico, que podem motivar o aparecimento de bacilos altamente resistentes à PZA sem obrigatoriamente causar mutações no gene *pncA* (LIMA; BISPO; SOUZA, 2011).

Figura 6 – Representação da estrutura química da Pirazinamida



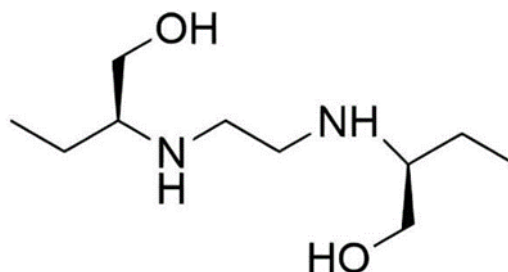
Fonte: Adaptado do Pubchem, 2023.

#### 2.5.1.4 Etambutol

Sintetizado em 1961, porém inserido no esquema terapêutico apenas cinco anos depois, o EMB é um agente bacteriostático contra bacilos metabolicamente ativos, que atua interferindo na biossíntese de arabinogalactano, principal polissacarídeo da parede celular da micobactéria, através da inibição da enzima arabinosil transferase, codificada pelo gene *embB*, que media a polimerização de arabinose para arabinogalactano (ARBEX et al., 2010; ROSSETTI et al., 2002). Sua estrutura química pode ser observada na Figura 7.

Os mecanismos de resistência a este fármaco ainda não são completamente compreendidos, porém, sabe-se atualmente que estão relacionados a mutações no gene *embB* (PALOMINO; MARTIN, 2014; ZHANG; YEW, 2009). Assim como os demais fármacos anti-TB, pode ocasionar efeitos colaterais moderados e graves, em baixa ocorrência, como problemas gastrointestinais, cardiovasculares, neurite retrobulbar e neurite periférica, sendo reversíveis a partir do uso de medicação adequada (BISAGLIA et al., 2003).

Figura 7 – Representação da estrutura química do Etambutol



Fonte: Adaptado do Pubchem, 2023.

### 2.5.2 Tuberculose resistente

A era dos antibióticos tem sido constantemente marcada por ciclos, consistindo na introdução de novos agentes antimicrobianos e uma subsequente emergência de resistência a estas drogas. A história da resistência a drogas como um problema no tratamento de TB é quase tão antiga quanto a introdução das primeiras drogas no tratamento da doença. Sabe-se que os fenótipos resistentes são causados por mutações cromossomais randômicas espontâneas em diferentes genes deste microrganismo. Entretanto, uso incorreto dos fármacos anti-TB contribui para seleção dessas cepas resistentes, provocando uma predominância de bactérias mutantes sobre as demais, podendo levar à resistência aos medicamentos a toda população bacteriana (DUCATI et al., 2006; PETRINI; HOFFNER, 1999).

Se o esquema terapêutico é equivocado, realizado de maneira irregular, com doses inadequadas ou interrompido precocemente, cepas resistentes aos medicamentos podem ser selecionadas, caracterizando a resistência adquirida (COURA, 2013). O tratamento da Tuberculose Drogarresistente (TB-DR) é um dos maiores desafios para o controle da doença no mundo, especialmente a que envolve resistência à rifampicina, isolada ou combinada a outros fármacos, pois se trata do medicamento mais ativo contra o bacilo da TB. Esquemas sem a rifampicina na sua composição requerem o uso de fármacos de segunda linha, resultando em tratamento com duração mais prolongada podendo chegar a 24 meses, com maior potencial de toxicidade e de pior prognóstico (CAMINERO et al., 2017; WHO, 2022).

A TB-DR pode ser classificada em: Monorresistência: resistência a somente um fármaco antituberculose; Polirresistência: resistência a dois ou mais fármacos antituberculose, exceto à associação rifampicina e isoniazida; Multirresistência (TB-MDR): resistência a pelo menos rifampicina e isoniazida; Resistência extensiva (TB-XDR): resistência à rifampicina e isoniazida acrescida de resistência a Fluoroquinolonas (qualquer delas) e aos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) (BRASIL, 2019).

### 2.5.2.1 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são uma classe de antibióticos amplamente utilizados devido à sua eficácia no tratamento de infecções bacterianas. A atividade desse grupo é dependente da concentração utilizada. Dentro dessa classe de medicamentos estão incluídos a Ciprofloxacina (CIP), Moxifloxacina (MOX) e Levofloxacina (LVX), que apresentam efeito antibacteriano inibindo a DNA girase, essencial para síntese de DNA bacteriano. No entanto, como qualquer medicamento, as fluoroquinolonas não estão isentas de efeitos colaterais. Os mais comuns incluem distúrbios gastrointestinais, náuseas, diarreia, dor de cabeça e tontura. Em casos raros, podem ocorrer efeitos colaterais mais sérios, como tendinites e danos aos nervos. Portanto, o uso desses antibióticos deve ser estritamente monitorado por um profissional de saúde (DISRATTHAKIT; DOI, 2010).

### 2.5.2.2 Aminoglicosídeos

Essa classe de antibióticos tem desempenhado um papel fundamental desde que a estreptomicina foi isolada e utilizada pela primeira vez em 1944. Ao longo das décadas, esses medicamentos evoluíram por várias gerações, sendo a terceira geração, composta por carbapenênicos e cefalosporinas, a mais impactante no combate às cepas resistentes. O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos envolve a ligação à subunidade ribossômica 30S, o que leva à inibição da síntese proteica bacteriana. É importante ressaltar que esses fármacos têm um efeito dependente da concentração e que sua toxicidade está relacionada à exposição cumulativa às drogas (NICOLAU et al., 1995).

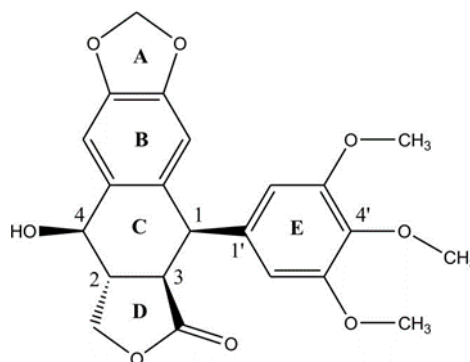
Esses medicamentos são frequentemente reservados para casos mais graves, pois atuam inibindo a síntese de proteínas bacterianas. Exemplos de aminoglicosídeos usados no tratamento da tuberculose resistente incluem Amicacina (AMK), Canamicina (KAN) e Capreomicina (CAP). No entanto, é importante observar que eles podem causar efeitos colaterais graves, como danos auditivos e renais. Portanto, seu uso deve ser cuidadosamente monitorado para garantir a eficácia do tratamento, ao mesmo tempo em que se minimizam os riscos associados (PELOQUIN; DAVIES, 2021).

## 2.6 PODOFILOTOXINA

A podofilotoxina (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>) é uma lignana de ocorrência natural, cuja estrutura foi elucidada pela primeira vez na década de 1930. É encontrada na fração solúvel em álcool chamada podofilina – uma resina de sabor amargo – em plantas pertencentes à família Berberidaceae, principalmente nas espécies *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi*. É conhecida por suas propriedades farmacológicas e tem servido de ponto de partida para o desenvolvimento de diferentes agentes anticancerígenos atualmente em uso clínico, como etoposídeo, teniposido e etopofos (GUERRERO et al., 2019). Devido à sua atividade biológica, a podofilotoxina tem permanecido objeto de várias investigações desde então (GORDALIZA et al., 2004; SHAH et al., 2021).

Apresenta um sistema de cinco anéis (ABCDE) com quatro centros quirais (C1-C4) seguidos — Figura 8. Existem cinco características estruturais importantes da podofilotoxina: (1) um grupo tetracíclico que vai do anel dioxólico (A) ao anel lactona (D); (2) quatro átomos de oxigênio localizados nos grupos funcionais lactona, metoxis, álcool secundário e oxóis; (3) anel E com configuração alfa localizado na posição 1; (4) quatro centros adjacentes assimétricos e (5) as propriedades estereoquímicas únicas de C4 definem o mecanismo de ação das moléculas (SHAH et al., 2021; YOU, 2005).

Figura 8 – Representação da estrutura química da molécula de Podofilotoxina



Fonte: SHAH et al., 2021.

O extrato de podofilotoxina já foi documentado no uso de várias complicações médicas, com propriedades neurotóxicas, inseticidas, anti-inflamatórias, imunossupressoras, antioxidantes e analgésicas (BOHLIN; ROSEN, 1996). Foi incluída na Farmacopeia dos EUA em 1820 e o uso desta resina foi prescrito para o tratamento de verrugas venéreas, sendo usada até os dias atuais como agente antiviral no tratamento de condiloma acuminado causada pelo papilomavírus humano (HPV) (GORDALIZA et al., 2004).

A principal aplicação medicinal da podofilotoxina é devido às suas propriedades como agente antimitótico, o que significa que ela interfere no processo de divisão celular. Isso a torna útil no tratamento de uma variedade de condições médicas, especialmente em oncologia, onde é utilizada no tratamento de algumas formas de câncer, como o câncer testicular e alguns tipos de câncer de pulmão. A podofilotoxina age inibindo a formação do fuso mitótico, impedindo assim a divisão celular (BOHLIN; ROSEN, 1996).

A praticidade clínica da podofilotoxina foi, no entanto, amplamente adulterada devido aos seus efeitos secundários indesejáveis, como toxicidade gastrointestinal, neurotoxicidade, perda de cabelo e supressão da medula óssea, motivando a exploração por análogos ou derivados sintéticos que pudessem oferecer uma alternativa terapêutica com menor toxicidade (CANEL et al., 2000).

Na pesquisa de novos agentes antimicrobianos, a podofilotoxina e seus derivados surgem como moléculas de grande interesse. Historicamente, essas substâncias demonstraram atividade contra uma variedade de doenças infecciosas. No entanto, seu potencial uso contra o *Mycobacterium tuberculosis*, permanece inexplorado. A tuberculose é uma ameaça persistente à saúde global, agravada pela resistência medicamentosa e pela necessidade de terapias mais eficazes e seguras. Nesse cenário, a avaliação de moléculas derivadas de podofilotoxina contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* representa uma abordagem inovadora. Este estudo visa preencher uma lacuna na pesquisa, explorando a promissora aplicação dessa classe de compostos na busca por novos tratamentos contra a doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade *in vitro* de derivados da Podofilotoxina frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e resistente para potencial utilização no tratamento da tuberculose.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antimicobacteriana *in vitro* de derivados de Podofilotoxina frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e multidroga resistente;
- Determinar a atividade citotóxica de derivados de Podofilotoxina em linhagem celular de mamíferos;
- Avaliar a interação farmacológica de derivados de Podofilotoxina junto a fármacos de referência do tratamento da tuberculose.

## 4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1 SÍNTESE E PREPARO DOS COMPOSTOS

A síntese, comprovação estrutural e caracterização dos compostos avaliados neste estudo foram realizadas no Laboratório do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca (USAL) - Espanha. As condições de reação e os processos químicos não podem ser divulgados, pois as informações precisarão se manter sigilosas para processo de patente. Neste estudo foram utilizados quinze compostos derivados de Podofilotoxina, listados na tabela 1. Os compostos foram apropriadamente diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) de acordo com seu peso molecular e padronizados na concentração de 34mM para solução estoque. Posteriormente, soluções de uso foram feitas com concentração ajustada para 256ug/mL, contendo 1% de DMSO.

Tabela 1 – Lista de compostos derivados de Podofilotoxina com seus respectivos pesos moleculares, sintetizados e caracterizados pelo laboratório de química da Universidade de Salamanca

Amostra	Peso molecular (g/mol)
AFJ-1	474,77
AFJ-2	501,76
AFJ-3	496,78
AFJ-4	506,77
AFJ-5	515,83
AFJ-6	492,75
AFJ-7	462,72
AFJ-8	415,71
AFJ-9	406,66
AFJ-10	490,73
AFJ-11	505,7
AFJ-12	461,69
AFJ-13	550,78
AFJ-14	529,59
AFJ-15	526,76

Fonte: A autora, 2023.



## 4.2 MICRORGANISMOS E PREPARO DO INÓCULO

O *M. tuberculosis* H37Rv foi utilizado neste estudo como cepa de referência da American Type Culture Collection, classificada como sensível a todas as drogas de primeira linha. Neste estudo foi utilizado também a cepa de *M. tuberculosis* 1576, com perfil de multidroga resistência (isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina e levofloxacina) fornecida pelo Laboratório Central de Saúde Pública - Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN – PE).

Com auxílio de uma alça de plástico, foi retirado grúmulos da cultura bacteriana de *Mtb* e transferidos para um tubo cônico contendo água destilada e pérolas de vidro para ser agitado em vórtex por dois minutos. Em seguida o tubo foi colocado em repouso vertical por quinze minutos, para permitir a sedimentação de grumos e redução de aerossol. O sobrenadante foi aspirado com auxílio de seringa de 1mL para outro tubo e padronizado na escala 01 de McFarland, com diluição posterior de 1:20 em caldo 7H9 suplementado com 10% de OADC.

## 4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos foi realizada pelo método colorimétrico de micro diluição em placas de 96 poços (PALOMINO et al., 2002). Em todos os poços externos da placa foram adicionados 200µL de água, com a finalidade de evitar a evaporação dos compostos, devido ao período de incubação de oito dias. Em seguida, foi adicionado nos demais poços 100 µL de caldo 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,2% de glicerol. Os compostos foram adicionados a placa em triplicata com diluições seriadas de 1:2, com concentração variando entre 128 e 0,5 µg/mL. Poços de controle negativo de atividade bacteriana também foram adicionados contendo um fármaco de referência, sendo RMP ou EMB para cepa sensível e AMK ou LVX para cepa com perfil MDR. Todos os fármacos de referência foram previamente solubilizados em solvente apropriado (água destilada estéril) e padronizados a uma solução estoque de 10 mg/mL, com ajuste de concentração apenas no momento de uso. Também foram incluídos poços de controle de esterilidade do meio.

Após o preparo da placa foi adicionado 100 µL do inóculo padronizado nos poços apropriados e as placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> durante 7 dias. Após o período de incubação, 30 µL de uma solução estéril de resazurina (Sigma Aldrich) a 0,01% foi adicionada em todos os poços e as placas foram reincubadas por 24 horas nas mesmas condições. O CIM foi definido como a menor concentração do composto que preveniu a mudança de coloração de azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido pela presença de viabilidade celular).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para a realização do ensaio de Citotoxicidade (CC<sub>50</sub>), foi empregado o teste de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em placas de 96 poços (MOSMANN, 1983). Neste estudo foi utilizada a linhagem J774A.1, correspondente à macrófago murino. Essas células são cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (estreptomicina – 100 µg/mL e penicilina – 100 µg/mL) mantidas a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Nas placas são adicionados 100 µL de células na concentração de 1x10<sup>5</sup> por mL. As placas foram mantidas incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir a adesão celular. Após esse período, o meio foi retirado e foi feita uma lavagem com salina para remoção de células mortas em suspensão, sendo posteriormente adicionados novamente 100µL do meio DMEM. Feito isso, as células foram tratadas com os compostos, adicionados em triplicatas em uma concentração variando de 128 a 0,5 µg/mL. Foram reservados poços de controle contendo DMSO a 1% e poços de controle não tratados, contendo apenas células e meio. As placas foram reincubadas por mais 24 horas nas mesmas condições.

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, e o reagente MTT foi adicionado às células a 10%. O MTT é uma substância incolor que é reduzida pelas células metabolicamente ativas para formar um produto insolúvel de cor roxa, chamado formazan. As células foram incubadas com o MTT por um período de 2 a 4 horas, para permitir a conversão do MTT em formazan pelas células metabolicamente ativas. Após a incubação, o MTT foi cuidadosamente removido, e o formazan formado nas células foi solubilizado utilizando o DMSO.

A absorvância do formazan solubilizado foi medida em um Leitor de Elisa a um comprimento de onda de 540 nanômetros. A intensidade da cor roxa formada é diretamente proporcional à atividade metabólica das células e, portanto, à sua viabilidade. Os valores de absorvância são registrados e comparados entre as células tratadas e não tratadas através de análise de regressão usando o software Graph Pad Prism.

#### 4.5 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O Índice de Seletividade (IS) é uma relação matemática (Equação 1) que compara a toxicidade do composto para o patógeno alvo, com sua toxicidade para a célula hospedeira. Ele é expresso como uma razão entre a concentração tóxica que afeta adversamente a célula (CC50) e a concentração eficaz que inibe o crescimento do patógeno (CIM). Nesse estudo o IS foi utilizado como um fator para selecionar compostos considerados promissores para a etapa seguinte de avaliação, sendo escolhidos aqueles que apresentaram o  $IS \geq 1$  (ORME, 2001).

Equação 1 – Cálculo do Índice de Seletividade

$$IS = CC50/CIM$$

#### 4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA

A Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foi realizada através do método de checkerboard de microdiluição bidimensional para avaliar a eficácia de combinação dos compostos selecionados para esta etapa, juntamente a fármacos do tratamento da TB. Essa metodologia ajuda a determinar se a combinação é sinérgica, indiferente ou antagonista. Sinergia ocorre quando a combinação de dois ou mais agentes antimicrobianos resulta em uma CIM menor do que a soma das CIMs individuais. Indiferença ocorre quando a combinação não afeta significativamente a CIM em comparação com os agentes usados individualmente. Nesse caso, a combinação não melhora nem prejudica a atividade antimicrobiana. Antagonismo ocorre quando a combinação resulta em uma CIM maior do que a CIM do agente mais eficaz usados isoladamente. Nesse caso, os agentes estão interferindo um no outro e reduzindo sua eficácia quando usados juntos (LORIAN, 2005).

Na coluna 1 da placa de 96 poços foi adicionado água destilada estéril e nos demais poços, foi adicionado o meio 7H9 suplementado com OADC. Na linha A da placa foi adicionado o composto e feita sua diluição seriada de 1:2 verticalmente até a linha G. Na coluna 11 foi adicionado o fármaco de referência correspondente e sua diluição seriada de 1:2 ocorre no sentido horizontal até a coluna 3, sendo a rifampicina e o etambutol utilizados para cepa sensível H37Rv; enquanto a amicacina e levofloxacina usados para cepa MDR 1576. A coluna 2 e a linha H foram reservadas para CIM do composto e do fármaco de referência, respectivamente. Também foram reservados poços de controle de crescimento positivo do inóculo, contendo apenas o meio e a bactéria e poços de controle de esterilidade do meio, contendo apenas meio (Figura 9).

Figura 9 – Representação esquemática de placa para realização do FIC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	ÁGUA		↓ Sentido de diluição dos compostos testes ↓									ÁGUA	
B		Controle do composto teste									← Sentido de diluição do antibiótico de referência →		C+
C												C+	
D													C-
E													C-
F													
G													
H			Controle de antibiótico										ÁGUA

Fonte: A autora, 2023.

Legenda: **C +**: Controle de crescimento positivo do inóculo; **C -**: Controle de esterilidade do meio

Após o preparo da placa foi adicionado 100 µL do inóculo padronizado nos poços apropriados e as placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> durante 7 dias. Após o período de incubação, 30 µL de uma solução estéril de resazurina (Sigma Aldrich) a 0,02% foi adicionada e as placas foram reincubadas por 48 horas nas mesmas condições.

Os resultados são interpretados pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) conforme a equação 2. O FICI é obtido através do somatório de FICA e FICB, onde FICA é calculado a partir do CIM do antibiótico (CIMA) na presença do composto (B), dividido pelo CIM do antibiótico (A) isolado; FICB é calculado a partir do CIM do composto (CIMB) na presença do antibiótico (A) dividido pelo CIM do composto (B) isolado. Valores de FICI  $\leq 0.50$  são considerados como combinações sinérgicas;  $> 0.50$  a  $4.0$ , indiferentes; e  $> 4$ , antagonistas. (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2013).

Equação 2 – Cálculo de Concentração Inibitória Fracionada

$$\sum FICI = FICA + FICB$$

Onde:

$$FICA = \frac{\text{CIM na presença de B}}{CIM_A}$$

$$FICB = \frac{\text{CIM}_B \text{ na presença de A}}{CIM_B}$$

Fonte: A autora, 2023.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A avaliação da atividade antimicrobiana dos derivados de Podofilotoxina indica que seis dos quinze compostos testados apresentam ação contra cepa sensível e multidroga resistente de *Mycobacterium tuberculosis*, sendo estes os compostos AFJ-2, AFJ-4, AFJ-6, AFJ-7, AFJ-8 e AFJ-9. Para ambas as cepas, as concentrações mínimas de inibição do crescimento bacteriano dos compostos que apresentaram atividade variaram de 8 a 64 µg/mL. Os demais compostos não apresentaram ação nas concentrações testadas e estão representados na Tabela 2 e Tabela 3 com CIM de >128 µg/mL. Os compostos que apresentaram os menores valores de CIM foram o AFJ-2 e AFJ-6 para cepa sensível; e AFJ-6 para cepa MDR-1576, com uma concentração de 8 µg/mL responsável pela inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 2 – Atividade *in vitro* dos compostos com base na concentração inibitória mínima em cepa sensível H37Rv; Citotoxicidade e Índice de Seletividade

Compostos	CIM (µg/mL)	CC <sub>50</sub> (%)	IS
	H37Rv		
AFJ-1	>128	5,97	< 0,047
AFJ-2	8	11,53	1,441
AFJ-3	>128	3,54	< 0,028
AFJ-4	32	4,50	0,140
AFJ-5	>128	5,28	< 0,041
AFJ-6	8	17,10	2,137
AFJ-7	64	8,56	0,133
AFJ-8	64	8,83	0,137
AFJ-9	32	33,74	1,054
AFJ-10	>128	20,36	< 0,159
AFJ-11	>128	12,69	< 0,099
AFJ-12	>128	18,36	< 0,143
AFJ-13	>128	13,25	< 0,103
AFJ-14	>128	28,96	< 0,226
AFJ-15	>128	22,66	< 0,177
RMP	0,250	80,39	321,56
EMB	1	100	100

Fonte: A autora, 2023.

Tabela 3 – Atividade *in vitro* dos compostos com base na concentração inibitória mínima em cepa MDR 1576; Citotoxicidade e Índice de Seletividade

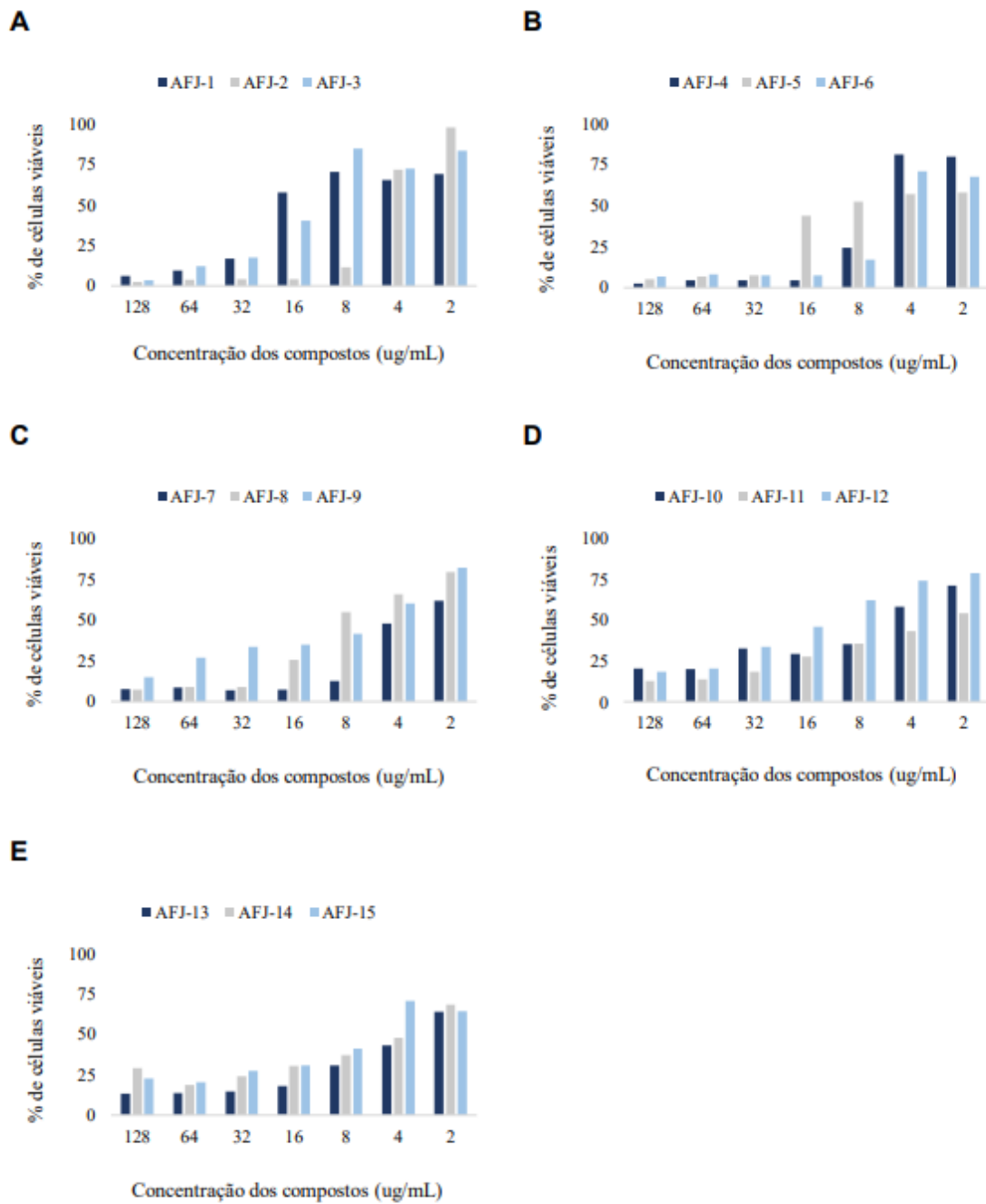
Compostos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CC <sub>50</sub> (%)	IS
	MDR 1576		
AFJ-1	>128	5,97	< 0,047
AFJ-2	16	4	0,250
AFJ-3	>128	3,54	< 0,028
AFJ-4	32	4,50	0,140
AFJ-5	>128	5,281	< 0,041
AFJ-6	8	17,10	2,137
AFJ-7	64	8,56	0,133
AFJ-8	64	8,83	0,137
AFJ-9	32	33,74	1,054
AFJ-10	>128	20,36	< 0,159
AFJ-11	>128	12,69	< 0,099
AFJ-12	>128	18,36	< 0,143
AFJ-13	>128	13,25	< 0,103
AFJ-14	>128	28,96	< 0,226
AFJ-15	>128	22,66	< 0,177
AMK	1,125	-	-
LVX	4	-	-

Fonte: A autora, 2023.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Através de três replicatas biológicas foi possível definir a toxicidade celular em linhagem de macrófagos murinos dos derivados de Podofilotoxina (Figura 10). Os resultados obtidos indicam que nenhum dos compostos testados foi capaz de manter ao menos 50% da viabilidade celular em concentrações eficazes contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 10 – Citotoxicidade apresentada após tratamento com derivados de Podofilotoxina em linhagem celular de macrófagos murinos (J774A.1)



Fonte: A autora, 2023.

Legenda: As figuras mostram em ordem decrescente de concentração dos compostos, partindo de 128 até 2 µg/mL, o percentual de células viáveis após o tratamento com as moléculas.



O índice de seletividade foi usado com a finalidade de selecionar compostos candidatos para o teste de interação farmacológica *in vitro*. Seguindo os parâmetros definidos previamente na metodologia, os compostos AFJ-2, AFJ-6 e AFJ-9 foram selecionados para cepa sensível H37Rv, com IS de 1,441, 2,137 e 1,054 respectivamente. Para cepa MDR-1576, foram selecionados os compostos AFJ-6 e AFJ-9, com IS de 2,137 e 1,054 respectivamente. Para efeito do cálculo do índice de seletividade, compostos que não apresentaram ação nas concentrações utilizadas, o CIM foi baseado na maior concentração testada (128 µg/mL), sendo o índice de seletividade indicado pelo símbolo “<” para representar que o valor não é exato.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA

Os compostos selecionados para esta etapa apresentaram efeito indiferente (FICI > 0.50 a 4.0) quando utilizados junto aos fármacos de tratamento da TB, sendo a rifampicina e etambutol para cepa sensível H37Rv e, amicacina e levofloxacina para cepa MDR-1576. Os resultados obtidos indicam que as combinações testadas não interagem sob nenhum aspecto de sua ação farmacodinâmica ou farmacocinética conforme apresentado nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Interação farmacológica de derivados de Podofilotoxina com fármacos do tratamento da Tuberculose frente a cepa sensível H37Rv

Compostos	Antimicrobianos	H37Rv			Efeito
		FIC <sub>A</sub>	FIC <sub>B</sub>	FICI	
AFJ-2	RMP	0,25	1	1,25	Indiferente
	EMB	0,25	1	1,25	Indiferente
AFJ-6	RMP	0,5	2	2,5	Indiferente
	EMB	1	1	2	Indiferente
AFJ-9	RMP	0,5	2	2,5	Indiferente
	EMB	1	2	3	Indiferente

Fonte: A autora, 2023.

Tabela 5 – Interação farmacológica de derivados de Podofilotoxina com fármacos do tratamento da Tuberculose frente a cepa multidroga resistente

Compostos	Antimicrobianos	H37Rv			Efeito
		FIC <sub>A</sub>	FIC <sub>B</sub>	FICI	
AFJ-6	AMK	1	1	2	Indiferente
	LVX	1	2	3	Indiferente
AFJ-9	AMK	1	1	2	Indiferente
	LVX	1	2	3	Indiferente

Fonte: A autora, 2023.

## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose representa uma área de pesquisa de extrema relevância, dada a crescente resistência da bactéria aos medicamentos existentes e a necessidade de terapias mais eficazes, seguras e acessíveis para combater essa doença. A complexidade intrínseca do Mtb, com sua parede celular única e sua capacidade de sobreviver dentro das células hospedeiras, confere-lhe uma resistência natural a muitos antibióticos convencionais, tornando a busca por novos tratamentos um grande desafio. A triagem de compostos químicos desempenha um papel fundamental no processo de desenvolvimento de novos fármacos, permitindo a identificação de moléculas que exibem atividade antibacteriana promissora contra a bactéria (BOHLIN; ROSEN, 1996).

Na busca por protótipos inovadores para o combate à tuberculose, várias metodologias são empregadas, abrangendo desde triagens *in vitro*, com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana das moléculas, até ensaios *in vivo*. Dentre as abordagens *in vitro*, a determinação da Concentração Inibitória Mínima destaca-se como um parâmetro fundamental a ser investigado, uma vez que a identificação de compostos com potencial atividade nessa etapa pode direcionar pesquisas subsequentes, como a otimização estrutural dessas moléculas, visando sua utilização em ensaios *in vivo* e futuros estudos clínicos (COOPER, 2013).

Dentro deste estudo, foram avaliados compostos inéditos pertencentes à classe dos derivados de Podofilotoxina. Os resultados dos testes de concentração inibitória mínima revelaram o potencial significativo dessa classe de compostos contra o *Mycobacterium tuberculosis*, abrangendo tanto cepas com perfil de sensibilidade quanto aquelas com perfil de resistência a múltiplas drogas. Dos quinze compostos testados, seis apresentaram atividade contra o Mtb, com concentrações inibitórias mínimas variando entre 8 e 64 µg/mL. Notavelmente, dois compostos, AFJ-2 e AFJ-6, demonstraram boa atividade antimicobacteriana contra a cepa sensível H37Rv, enquanto apenas o composto AFJ-6 exibiu esse potencial contra a cepa MDR. Essa classificação está em conformidade com o critério estabelecido por Ramón-García e colaboradores (2016), que considera um potencial antimicrobiano promissor quando a CIM é igual ou inferior a 8 µg/mL.

Esses resultados representam um marco importante na busca por novas terapias antituberculosas, indicando que os derivados de Podofilotoxina têm o potencial de se tornar uma classe de compostos relevante no tratamento da doença. O fato de apresentarem atividade tanto contra cepa sensível quanto resistente é especialmente promissor, visto que a resistência a múltiplas drogas é uma das maiores preocupações no cenário atual no combate à tuberculose. No entanto, é crucial reconhecer que a jornada rumo ao desenvolvimento de novos fármacos é complexa e exige uma série de estudos adicionais, incluindo ensaios *in vivo* e ensaios clínicos subsequentes (ISLAM et al., 2021).

Essa classe de moléculas, embora nunca avaliada especificamente contra o *Mycobacterium tuberculosis*, já teve sua atividade demonstrada em estudos prévios envolvendo a leishmaniose. Trabalhos realizados por Guerrero e colaboradores (2019) e Martínez (2015) indicam a atividade antiparasitária *in vitro* que derivados da podofilotoxina apresentam. Além disso, os derivados de podofilotoxina já são amplamente reconhecidas como compostos farmacologicamente ativos de amplo espectro, que conduziram à descoberta de medicamentos anticancerígenos clinicamente viáveis, a exemplo do etoposido, teniposido e etopofos (KAMAL et al., 2015; SHAH et al., 2021).

Embora a atividade antimicobacteriana contra o Mtb seja uma característica distintiva deste estudo, a capacidade dessas moléculas de combater outras doenças infecciosas, como a leishmaniose, sugere uma versatilidade promissora dessa classe de compostos. A podofilotoxina e seus derivados possuem um amplo espectro de potencial farmacológico (ESCUADERO MARTÍNEZ, 2015; GUERRERO et al., 2019). A possibilidade de modificações químicas traz a molécula uma maior versatilidade na otimização dos efeitos apresentados para servir como um composto medicinal. Essas informações ressaltam a relevância e o potencial terapêutico dessa classe de compostos, mesmo quando aplicada a diferentes contextos médicos, e podem oferecer valiosas direções para pesquisas futuras, incluindo o desenvolvimento de novos fármacos para doenças infecciosas, como a tuberculose.

A podofilotoxina é conhecida na literatura por ter propriedades citotóxicas e interferir na dinâmica dos microtúbulos nas células humanas. Embora as células bacterianas sejam fundamentalmente diferentes das células humanas, uma hipótese para seu mecanismo de ação no *Mycobacterium tuberculosis* é de que a molécula afeta os microtúbulos bacterianos de maneira semelhante, podendo prejudicar a capacidade da bactéria de realizar funções essenciais, interferindo na divisão e replicação bacteriana. Isso poderia resultar na inibição do crescimento da bactéria e, potencialmente, na sua eliminação (MEDRADO et al., 2014).

É importante ressaltar que essa é uma hipótese teórica e que a ação exata da podofilotoxina contra o Mtb ainda precisa ser investigada por meio de estudos laboratoriais e ensaios específicos para determinar o mecanismo de ação preciso, como o uso de microscopia eletrônica de transmissão ou microscopia de fluorescência para examinar as mudanças morfológicas nas células bacterianas após a exposição à podofilotoxina (MEDRADO et al., 2014). Além disso, podem ser utilizadas técnicas de biologia molecular, como Western blotting ou ensaios de interação proteína-ligante, para identificar se a podofilotoxina se liga a proteínas específicas na bactéria, elucidando o alvo molecular da molécula. Ademais, também é possível realizar a análise de expressão gênica, através de técnicas de transcriptômica, para identificar genes que são regulados diferencialmente em resposta à molécula.

Outro parâmetro fundamental a ser avaliado na busca de um novo protótipo é a toxicidade celular apresentada. De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (international standard organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer molécula para uso em dispositivos biomédicos. Apesar de efeitos adversos serem observados em todos os fármacos do esquema terapêutico da TB, novos compostos devem apresentar os menores indicativos de toxicidade possíveis. Nesse contexto, o teste de citotoxicidade foi essencial para definir a toxicidade dos derivados de podofilotoxina, utilizando a linhagem celular de macrófagos murinos do tipo J774A.1.

Os resultados apresentados demonstram altos índices de citotoxicidade dos derivados de podofilotoxina, com uma viabilidade celular muito baixa após a exposição, levantando preocupações significativas sobre a segurança das moléculas estudadas. Uma viabilidade celular abaixo de 50% após o tratamento sugere uma alta toxicidade aguda desses compostos para as células hospedeiras (GORDALIZA et al., 2004). Esses achados apontam a necessidade de aprofundar a pesquisa em busca de estratégias que possam mitigar a citotoxicidade desses derivados de podofilotoxina. Além disso, ressaltam a complexidade do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, que devem equilibrar eficácia antimicrobiana com segurança para as células hospedeiras.

A linhagem celular J774A.1 é considerada fundamental em estudos de novas moléculas, principalmente contra o gênero *Mycobacterium* sp., visto que o Mtb é um patógeno intracelular destas células (ISLAM et al., 2021). Entretanto, testes em outras linhagens celulares tornam-se necessárias a fim de avaliar o comportamento dos derivados frente a outros tipos celulares relevantes no estudo contra o *Mycobacterium tuberculosis*, como a THP-1 (células monocíticas humanas), Vero (células renais de macaco) e HepG2 (células hepáticas humanas).

Trabalhos como o de Guerrero (2019) e Gordaliza (2004) fizeram uso de derivados de podofilotoxina na avaliação da toxicidade celular em células de mamíferos. Os dados de ambos os trabalhos divergem no nível de citotoxicidade apresentado pelos derivados de podofilotoxina. Enquanto Guerrero (2019) observou moléculas pouco tóxicas, Gordaliza (2004) observou uma alta citotoxicidade das moléculas usadas, levando a necessidade de realizar uma nova síntese dos compostos com modificações na sua estrutura. Essa divergência na toxicidade celular apresentada é devido ao fato de que apesar de se tratar da mesma classe de compostos, pequenas mudanças na estrutura química podem ser responsáveis pela alteração da toxicidade celular (GORDALIZA et al., 2004; GUERRERO et al., 2019).

Sendo assim, esses resultados destacam a importância de uma pesquisa contínua e ajustes nos compostos derivados de podofilotoxina. O alto nível de toxicidade celular apresentada pelas moléculas testadas no presente trabalho indica a necessidade de modificações na estrutura química dessas moléculas, para melhorar a eficácia antimicrobiana, tornando-os mais seletivos para *Mycobacterium tuberculosis* e menos tóxicos para as células hospedeiras.

Devido à crescente resistência aos medicamentos e à complexidade do Mtb, muitas vezes são necessárias terapias combinadas, que envolvem a administração de vários fármacos simultaneamente. Portanto, novos fármacos também são avaliados quanto à sua eficácia quando usados em conjunto com medicamentos já existentes, buscando maximizar a eficácia terapêutica (BHUSAL; SHIOHIRA; YAMANE, 2005).

Os compostos testados apresentaram efeito indiferente quando utilizados junto aos antimicrobianos rifampicina e etambutol, frente a Mtb sensível, e amicacina e levofloxacina frente a cepa MDR, 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 relatos de falhas do tratamento quanto ao uso da monoterapia (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Os resultados obtidos neste estudo indicam um potencial uso dessas moléculas contra o Mtb. Entretanto, fica claro que os derivados de podofilotoxina enfrentam desafios significativos em relação à sua toxicidade tornando necessária a busca por estratégias de otimização desses compostos, a partir de alterações na estrutura química, de modo a diminuir a toxicidade apresentada, mantendo seu efeito antimicrobiano. Além disso, novas estratégias nas formas de entrega de drogas, como a utilização de nanossistemas, podem ser responsáveis pela redução da toxicidade celular, que se apresenta como o principal problema dessa classe de compostos.

A nano encapsulação é uma técnica avançada que envolve a incorporação de moléculas ativas em nano carreadores, permitindo a liberação controlada no local da infecção. Isso pode aumentar a eficácia dos derivados de podofilotoxina, superando altas concentrações inibitórias mínimas e reduzindo a toxicidade para células hospedeiras. Além disso, a nano encapsulação pode melhorar a solubilidade e biodisponibilidade, potencialmente encurtando o tempo de tratamento e aumentando a adesão do paciente. Portanto, como trabalho futuro, recomenda-se investigar a nano encapsulação das moléculas de derivados de podofilotoxina como uma estratégia para melhorar a eficácia e segurança desses compostos no tratamento da tuberculose, superando desafios identificados nos resultados e tornando-os candidatos robustos para ensaios clínicos e aplicações futuras.

Em última análise, o desenvolvimento de novos fármacos para a tuberculose é uma jornada desafiadora, mas essencial para melhorar os tratamentos disponíveis e reduzir o impacto global dessa doença milenar. O financiamento contínuo, a regulamentação rigorosa e a dedicação da comunidade global de pesquisa são fundamentais para o progresso nessa área crítica da saúde pública. A colaboração global desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos para a tuberculose. Isso envolve parcerias entre organizações de pesquisa, governos, agências de saúde e empresas farmacêuticas em todo o mundo, compartilhando recursos e conhecimentos para impulsionar a inovação e a descoberta.



## 7 CONCLUSÃO

A pesquisa aqui apresentada demonstrou que os derivados de Podofilotoxina possuem atividade antimicrobiana contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo aquelas resistentes a medicamentos. Os resultados dos testes de concentração inibitória mínima revelaram a eficácia desses compostos, com concentrações que demonstraram ser efetivas contra as cepas testadas. No entanto, é importante destacar que essa atividade antimicrobiana foi acompanhada por uma alta citotoxicidade, indicando um risco significativo de danos às células hospedeiras.

Esses resultados abrem portas para novas perspectivas no tratamento da tuberculose, especialmente no contexto de cepas resistentes a medicamentos. A possibilidade de utilizar derivados de Podofilotoxina como agentes terapêuticos oferece uma abordagem para melhorar a eficácia no combate a essa doença global. A pesquisa realizada evidencia a importância da busca contínua por novos agentes antimicrobianos e o potencial das moléculas derivadas de Podofilotoxina como candidatas viáveis.

Embora esses resultados sejam animadores em relação à atividade antimicrobiana, é importante considerar os desafios associados à citotoxicidade significativa observada. A toxicidade para as células hospedeiras é uma preocupação crítica que precisa ser abordada em estudos futuros, visando a otimização dessas moléculas para minimizar danos às células saudáveis. Além disso, é importante reconhecer que esta pesquisa foi conduzida *in vitro*, e a transição para estudos *in vivo* e ensaios clínicos é necessária para validar plenamente o potencial terapêutico desses derivados.

## REFERÊNCIA

- ABULFATHI, A. A. et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Rifampicin in Human Tuberculosis. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 58, n. 9, p. 1103–1129, 1 set. 2019
- AHMAD, Z.; MAKAYA, N. H.; GROSSET, J. Chapter 1: History of Drug Discovery: Early Evaluation Studies and Lessons Learnt from Them. Em: [s.l: s.n.]. p. 2–9.
- ARBEX, M. A. et al. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1: fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 626–640, out. 2010.
- BAÑULS, A.-L. et al. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1261–1269, 1 nov. 2015.
- BHUSAL, Y.; SHIOHIRA, C. M.; YAMANE, N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against Mycobacterium tuberculosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 4, p. 292–297, out. 2005.
- BOHLIN, L.; ROSEN, B. Podophyllotoxin derivatives: drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 8, p. 343–351, ago. 1996.
- BRASIL. **Manual de Recomendações Para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: [s.n.].
- BRASIL. **Boletim Epidemiológico**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.gov.br/saude>.
- CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. et al. Fast detection of drug interaction in Mycobacterium tuberculosis by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660–663, nov. 2013.
- CAMINERO, J. 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, p. 1700648, 5 jul. 2017.
- CANEL, C. et al. Podophyllotoxin. **Phytochemistry**, v. 54, n. 2, p. 115–120, maio 2000.
- CHURCHYARD, G. et al. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl\_6, p. S629–S635, 3 nov. 2017.
- COOPER, C. B. Development of Mycobacterium tuberculosis Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 7755–7760, 24 out. 2013.
- COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 1

CRUZ-KNIGHT, W.; BLAKE-GUMBS, L. Tuberculosis. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 40, n. 3, p. 743–756, set. 2013.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 3 mar. 2017.

DISRATTHAKIT, A.; DOI, N. In Vitro Activities of DC-159a, a Novel Fluoroquinolone, against Mycobacterium Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2684–2686, jun. 2010.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption-A review on tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 101, n. 7, p. 697–714, 2006.

ESCUADERO MARTÍNEZ, J. M. **Actividad y modo de acción leishmanicida de nuevos derivados de la podofilotoxina y quinonas**. [s.l.] Universidad de León, set. 2015.

FLOSS, H. G.; YU, T.-W. Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 621–632, 1 fev. 2005.

GORDALIZA, M. et al. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 441–459, set. 2004.

GUERRERO, E. et al. Actividad analgésica y antiinflamatoria de derivados de podofilotoxina. **Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener**, v. 2, n. 1, p. 93–102, 30 set. 2019.

HUF, G.; KRITSKI, A. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 2, p. 237–245, abr. 2012.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5**. , 2009.

ISLAM, M. I. et al. Antimicrobial activity of IDD-B40 against drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 740, 12 jan. 2021.

KAMAL, A. et al. Podophyllotoxin derivatives: a patent review (2012 – 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 9, p. 1025–1034, 2 set. 2015.

KIESER, K. J.; RUBIN, E. J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 550–562, ago. 2014.

KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberculose. **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 19, n. 15, p. 221–230, 1882.

LIMA, C. H. DA S.; BISPO, M. DE L. F.; SOUZA, M. V. N. DE. Pyrazinamide: An Essential Drug in the Tuberculosis Treatment. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, 2011.

LIU, S. S.; WANG, L. Z.; TANG, S. J. [Advances in chemotherapy of multidrug-resistant and rifampicin-resistant tuberculosis]. **Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases**, v. 43, n. 4, p. 371–375, 12 abr. 2020.

LORIAN, VICTOR. **Antibiotics in laboratory medicine**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

MEDRADO, H. H. S. et al. DISTRIBUTION, BIOLOGICAL ACTIVITIES, SYNTHESIS, AND PURIFICATION METHODS FOR PODOPHYLLOTOXIN AND ITS DERIVATIVES. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 243–258, 2014.

MOSMANN, T. 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, dez. 1983.

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, 679–80, ago. 1995.

OCCHINERI, S. et al. Pretomanid for tuberculosis treatment: an update for clinical purposes. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, v. 3, p. 100128, 2022.

ORME, I. **Search for new drugs for treatment of tuberculosis**. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2001.

OSBORNE, R. First novel anti-tuberculosis drug in 40 years. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 89–90, 7 fev. 2013.

PALOMINO, J.; MARTIN, A. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 317–340, 2 jul. 2014.

PALOMINO, J.-C. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, ago. 2002.

PELOQUIN, C. A.; DAVIES, G. R. The Treatment of Tuberculosis. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 110, n. 6, p. 1455–1466, 5 dez. 2021.

PETRINI, B.; HOFFNER, S. Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 2, p. 93–97, out. 1999.

RAMÓN-GARCÍA, S. et al. Repurposing clinically approved cephalosporins for tuberculosis therapy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34293, 28 set. 2016.

RIEDER, H. L. **Epidemiologic Basis of Tuberculosis Control**. Paris: [s.n.].

ROSEMBERG, J. **Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização**. Rio de Janeiro: [s.n.].

ROSSETTI, M. L. R. et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 4, p. 525–532, ago. 2002.

ROSSMAN, M.; MACGREGOR, R. Introduction and brief history. **Philadelphia: McGraw-Hill**, 1995.

SCHITO, M.; HANNA, D.; ZUMLA, A. Tuberculosis eradication versus control. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 10–13, mar. 2017.

SHAH, Z. et al. Podophyllotoxin: History, Recent Advances and Future Prospects. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 603, 19 abr. 2021a.

SHAH, Z. et al. Podophyllotoxin: History, Recent Advances and Future Prospects. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 603, 19 abr. 2021b.

SINGH, P. et al. **Cell envelope lipids in the pathophysiology of Mycobacterium tuberculosis. Future Microbiology** Future Medicine Ltd., , 1 maio 2018.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2022**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders>>.

YEW, W. Clinically Significant Interactions with Drugs Used in the Treatment of Tuberculosis. **Drug Safety**, v. 25, n. 2, p. 111–133, 2002.

YOU, Y. Podophyllotoxin Derivatives: Current Synthetic Approaches for New Anticancer Agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 13, p. 1695–1717, 1 maio 2005.

ZHANG, Y. et al. The catalase—peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 591–593, ago. 1992.

ZHANG, Y.; YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 11, p. 1320–30, nov. 2009.