

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA**

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL PRÉ-CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTI
TUBERCULOSE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPLEXOS HETEROLÉPTICOS DE
RUTÊNIO(II) COM FOSFINAS, DIIMINAS E PICOLINATO COMO LIGANTES**

FERNANDO ROGÉRIO PAVAN

ARARAQUARA - SP

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA**

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL PRÉ-CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTI
TUBERCULOSE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPLEXOS HETEROLÉPTICOS DE
RUTÊNIO(II) COM FOSFINAS, DIIMINAS E PICOLINATO COMO LIGANTES**

FERNANDO ROGÉRIO PAVAN

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Prof^a. Dr^a. CLARICE QUEICO FUJIMURA LEITE
ORIENTADORA

ARARAQUARA - SP
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P337d Pavan, Fernando Rogério
Determinação do perfil pré-clínico da atividade anti-tuberculose *in vitro* e *in vivo* de complexos heteroléticos de Rutênio(II) com fosfinas, diiminas e picolinato como ligantes / Fernando Rogério Pavan. – Araraquara, 2011
82 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Clarice Queico Fujimura Leite

1. Novos fármacos. 2. Tuberculose. 3. Rutênio. I. Leite, Clarice Queico Fujimura, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICO ESTE TRABALHO...

A meus pais, Nelson e Nadir, por tudo que eles representam em minha vida, pelo apoio, dedicação, carinho, amor e ensinamentos. Se aqui cheguei e estou devido tudo a vocês.

A meus irmãos, Paulo e Aline, por todas nossas conversas e preocupações um com o outro. Pelo amor e carinho existente dentro dessa família.

A minha noiva Miriane que foi, é e sempre será a minha base e fonte de inspiração; minha companheira, amiga em todos os momentos, felizes e tristes.

A Prof^a. Clarice, que ultrapassou todos os limites de uma orientação, tornando-se há muito tempo uma mãe e amiga, além de ser o ser humano de quem possuo a maior admiração.

MUITO OBRIGADO...

À Pesquisadora e Pos-Doc, amiga e segunda mãe (madrinha como ela gosta), Daisy Nakamura Sato, por todo apoio, confiança, dedicação, preocupação e carinho. Toda maturidade e confiança que tenho em me dedicar a esse trabalho e a outros são exclusividade de seus incentivos e confiança em meu trabalho;

À minha cunhada Mônica pelas conversas e incentivos que tivemos juntamente com o presente de me conceder um lindo sobrinho, Gabriel;

À meu sobrinho Gabriel, apenas pela sua existência em tornar nossas vidas mais felizes;

A meu grande amigo de sempre Ederlan, por nossas conversas intelectuais e informais que sempre resultam em novas idéias;

Ao meu grande amigo Adolfo, por estar sempre presente ao meu lado;

Aos meus amigos de laboratório Marcelo, Heloisa, Isabela, Paula, Leonardo, Karina e Natália;

Ao Prof. Alzir e Victor que tem nos apoiado desde o plantio de nossa idéia anos atrás e continuam sendo toda a base de nossa pesquisa;

Ao Prof. Dr. Scott Gary Franzblau, pela oportunidade na realização do Doutorado Sanduíche no Institute for Tuberculosis Research of University of Illinois at Chicago;

A todos meus amigos distantes de Jaú e Ribeirão Preto, mas sempre presentes em minha vida;

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação, Cláudia, Laura, Sônia e Joyce pelo acolhimento, atenção e colaboração nos momentos que necessitei;

Às excelentes profissionais do laboratório didático de Microbiologia Ednéia, Marisa e Sílvia por todo apoio durante as aulas ministradas para os alunos de graduação;

À todos os professores do departamento de Ciências Biológicas da FCFAR;

A FAPESP pela bolsa de doutorado concedida (proc. nº 2008/10380-2) e pelo projeto regular concedido associado ao projeto de bolsa (proc. nº 2009/06499-1), que foram fundamentais e essenciais para o desenvolvimento de todo esse trabalho.

A Deus, por me conceder a vida...

Imagine

*Imagine não haver o paraíso
Nenhum Inferno abaixo de nós
Acima de nós só o céu*

*Imagine todas as pessoas
Vivendo o presente*

*Imagine que não houvesse nenhum país
Não é difícil imaginar
Nenhum motivo para matar ou morrer*

*Imagine todas as pessoas
Vivendo a vida em paz*

*Imagine que não há posses
Eu me pergunto se você pode
Sem a necessidade de ganância ou fome
Uma irmandade dos homens*

*Imagine todas as pessoas
Partilhando todo o mundo*

*Você pode dizer que eu sou um sonhador
Mas eu não sou o único
Espero que um dia você junto-se a nós
E o mundo viverá como um só*

John Lennon

RESUMO

Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa e curável transmitida pelo ar. A taxa de mortalidade reduziu globalmente em 2007, entretanto, TB-MDR, XDR e a co-infecção TB/HIV têm sufocado as tentativas de controle da TB, causando sofrimento e morte em todo o mundo. Adicionalmente, um terço da população mundial está infectada com o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) em estado de latência, o qual serve como reservatório para TB ativa. A rifampicina (RMP), descoberta há mais de 40 anos, representa a última classe de antibióticos introduzida como fármaco de primeira-linha no tratamento da TB. No esforço de sanar esta falha, é crescente a importância da Química Medicinal Inorgânica como um aliado na pesquisa de novos fármacos contra TB. É bem conhecido que alguns elementos metálicos desempenham papel fundamental nos seres vivos. Tem sido relatado desde 1970 que compostos de rutênio (Ru) exibem atividade anti-tumoral. Inclusive, alguns destes compostos se encontram na fase clínica de avaliação. Compostos de Ru foram avaliados também em nosso laboratório demonstrando atividade contra MTB. Os complexos com Ru(II) demonstraram ser mais ativos contra o MTB em relação a forma do ligante livre, em até 150 vezes, com baixa citotoxicidade e alta seletividade. Os resultados promissores inspiraram a procura de uma melhor abordagem para explorar o perfil pré-clínico *in vitro* e *in vivo* desses compostos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma linha de pesquisa (*pipeline*) com ensaios fenotípicos rápidos, sensíveis, específicos e de baixo custo na pesquisa de um novo fármaco contra TB. Paralelamente, avaliou-se os melhores complexos heterolépticos de Ru(II) com fosfinas, diiminas e picolinato como ligantes, pré-selecionados, frente a esse *pipeline*. Os resultados obtidos com os complexos de Ru(II) (compostos **SCAR**), *in vitro*, são comparáveis e/ou melhores do que os fármacos de primeira escolha da terapêutica atual. Os resultados *in vivo* garantiram segurança terapêutica dos complexos pela sua baixa toxicidade. Como conclusão, foram revelados pela primeira vez compostos de Ru(II) como uma nova classe de compostos inorgânicos que podem se tornar agentes anti-TB. Os resultados dos complexos **SCAR** indicaram “*lead compounds*” cuja estruturas dos compostos serão utilizadas como modelo de otimização (*lead optimization*). O *pipeline* baseado em ensaios fenotípicos utilizado para análise dos complexos mostrou ser rápido, sensível, específico e de baixo custo na pesquisa de um novo fármaco contra TB.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a preventable and curable infectious disease transmitted through the air. The mortality rates decreased globally in 2007, however, MDR and XDR TB, and co-infection TB/HIV have stifled attempts to control TB causing suffering and death worldwide. Additionally, a third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in state of latency, which serves as a reservoir for active TB. Rifampicin (RMP), discovered more than 40 years ago, represents the last class of antibiotics introduced as first-line drug to treat TB. In an effort to correct this failure is an increasingly importance of Inorganic Medicinal Chemistry as an ally in the search for new drugs against TB. It is well known that some metallic elements play a fundamental role in living organisms. It has been reported since 1970 that compounds of ruthenium (Ru) exhibit anti-tumor activity. Even some of these compounds are in clinical phase of evaluation. Ru compounds were evaluated in our laboratory showing activity against MTB. Complexes with Ru(II) showed activity against MTB in relation to the free ligand up to 150 higher, with low cytotoxicity and high selectivity. The promising results inspired the search for a better approach to explore the pre-clinical *in vitro* and *in vivo* profile of these compounds. So, the objective of this study was to develop a research line (pipeline) fast, sensitive, specific and low-cost phenotypic testing in the search for a new drug against TB. At the same time the best complexes of heteroleptic Ru(II) phosphine/diimines/picolinate, pre-selected, against several biological *in vitro* and *in vivo* assays. Those evaluated assays were inserted into the pipeline developed at our laboratory. The *in vitro* results obtained with the Ru(II) (compounds **SCAR**) complexes are comparable and/or better than the first choice drugs of the current therapy. The *in vivo* results of treatment with the complexes ensured therapeutic safety by showing low toxicity. In conclusion, for the first time were introduced Ru(II) compounds as a new class of inorganic compounds that can become anti-TB agents. The results of the **SCAR** complexes indicated "lead compounds" which the structures of the compounds will used as optimization model (lead optimization). The pipeline based on phenotypic assays used to analyze the complexes proved to be fast, sensitive, specific and low-cost in the search for a new drug against TB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fármacos de primeira escolha contra TB.....	18
Figura 2.	Fármacos de segunda escolha contra TB.....	19
Figura 3.	Abordagens para pesquisa de novas drogas anti-TB.....	23
Figura 4.	Primeiros compostos ativos contra MTB.....	26
Figura 5.	Complexos de rutênio fosfina-picolinato.....	27
Figura 6.	Estrutura dos complexos SCAR.....	31
Figura 7.	Checkerboarder 2D.....	39
Figura 8.	Coleta da amostra do ensaio de biodisponibilidade oral.....	45
Figura 9.	<i>Pipeline</i> : Pesquisa de novos fármacos anti-TB, Laboratório “Prof. Dr. Hugo David” FCFAR/UNESP Araraquara.....	70
Esquema 1.	Cálculo da Concentração Inibitória Fracionada.....	37
Gráfico 1.	Curva ROC determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e <i>cut-off</i> da INH.....	49
Gráfico 2.	ROC determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e <i>cut-off</i> da RMP.....	50
Gráfico 3.	Curva ROC determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e <i>cut-off</i> da EST.....	51
Gráfico 4.	Curva ROC determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e <i>cut-off</i> da EMB.....	52
Gráfico 5.	Três semanas de tratamento com os compostos SCAR e a RMP contra MTB Erdmann em camundongos BALB/c no modelo de infecção aguda.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	CIM dos compostos de Ru e dos fármacos padrão frente ao H ₃₇ Rv em diferentes condições.....	46
Tabela 2.	Teste de sensibilidade de 58 isolados clínicos sensíveis, mono e MDR-TB pelo método do BACTEC™ MGIT™ 960 e REMA.....	49
Tabela 3.	Valores de CIM dos complexos de Ru frente aos isolados clínicos sensíveis, mono e MDR-TB.....	54
Tabela 4.	Resultados de interação entre os compostos de Ru com RMP, INH, EST, EMB e MOX contra MTB H ₃₇ Rv.....	57
Tabela 5.	CIM dos compostos de Ru e dos fármacos padrão frente ao MTB H ₃₇ Rv (pFCA-luxAB) em estágio de persistente sem replicação fase II (PSR II).....	58
Tabela 6.	Espectro de Atividade dos compostos de Ru e das drogas padrões.....	60
Tabela 7.	Concentração única administrada via oral e a porcentagem de perdas dos animais.....	61
Tabela 8.	Dados do ensaio de <i>screening</i> farmacocinético utilizando amostras de soro e o ensaio do REMA.....	68
Tabela 9.	Critérios de seleção da primeira etapa (<i>screening</i>) que indicarão os compostos que seguem no <i>pipeline</i> daqueles que não seguem. Esses poderão ser descontinuados ou alterados e novamente avaliados.....	71
Tabela 10.	Critérios de seleção da segunda etapa (pré-clínico <i>in vitro</i>) que indicarão os compostos que seguem no <i>pipeline</i> daqueles que não seguem. Esses poderão ser descontinuados ou alterados e novamente avaliados.....	72
Tabela 11.	Critérios de seleção da última etapa (pré-clínico <i>in vivo</i>) que selecionarão os compostos do <i>pipeline</i> para a triagem clínica daqueles que não seguirão. Esses poderão ser descontinuados ou alterados e novamente avaliados.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC - Área sob a curva
ASB - Albumina de Soro Bovino
BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes
CAA - Crescimento ativo aeróbio
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLF - Clofazimina
CM - Canamicina
CMC - Carboximetilcelulose
CS - Cicloserina
DMSO - Dimetil-sulfóxido
EMB - Etambutol
EST - Estreptomicina
ETM - Etionamida
GTM - Gentamicina
INH - Isoniazida
LORA - *Low Oxygen Recovery Assay*
MET - Metronidazol
MOX - Moxifloxacino
MTB - *Mycobacterium tuberculosis*
OADC – *Oleic, Albumin, Dextrose, Catalase enrichment*
PAS - Ácido para-aminossalicílico
PBS - Solução salina tamponada com fosfato à 1% em pH ≈ 7,0
PSR I, II – Persistente sem Replicação
PZA - Pirazinamida
REA - Relação estrutura atividade
RMP - Rifampicina
RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute medium*
ROC curve - *Receiver Operating Characteristic*
Ru - Rutênio
SCAR1 – [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆
SCAR2 – [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆
SCAR4 – [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆
SCAR5 – *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆
SCAR6 – *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)]
SCAR7 – Ru(pic)(dppe)(phen)
SFB - Soro Fetal Bovino
TB - Tuberculose
TB-MDR - TB Multi-Droga-Resistente
TB-XDR - TB Extensivamente-Droga-Resistente
TCT - Tiacetazona
REMA- *Resazurin Microtiter Assay*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

CAPÍTULO I

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Aspectos Biológicos do MTB e aspectos da resistência às drogas.....	16
1.2.	Tratamento.....	18
1.2.1.	Tratamento no Brasil.....	20
1.3.	Abordagens para pesquisa de um novo fármaco.....	21
1.4.	Potencialidade dos compostos de coordenação com metais no tratamento da TB.....	24
1.4.1.	Rutênio (Ru).....	25
2.	OBJETIVOS	28
2.1.	Geral.....	28
2.2.	Específicos.....	28
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1.	Material	30
3.1.1.	Síntese das amostras.....	30
3.1.2.	Drogas de Referência.....	31
3.1.3.	Solução Reveladora.....	31
3.1.4.	Isolados clínicos de MTB sensíveis, mono e MDR-TB.....	31
3.1.5.	Cepas Padrão.....	32
3.1.6.	Animais de Experimentação.....	32
3.1.7.	Parque de Equipamentos.....	33
3.2.	Metodologias	33
3.2.1.	Preparo das Suspensões Bacterianas.....	33
3.2.1.1.	MTB H ₃₇ Rv (ATCC 27294), MTB Erdmann (ATCC 35801).....	33
3.2.1.2.	Preparo da suspensão bacilar de MTB recombinante H ₃₇ Rv ATCC 27294 (pFCA-luxAB) – Modelo de Wayne.....	34
3.2.1.3.	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213), <i>E. coli</i> (ATCC 25922) e <i>C. albicans</i> (ATCC 10231).....	35
3.2.1.4.	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 700084).....	35
3.2.1.5.	Determinação da CIM frente ao MTB H ₃₇ Rv em diferentes condições ambientais (normal; pH 6,0; 4% de ASB e 10% de SFB).....	35
3.2.1.6.	Construção do painel de isolados clínicos de MTB sensíveis, mono e MDR-TB.....	36
3.2.1.7.	Determinação da atividade anti-MTB dos compostos frente aos 25 isolados clínicos selecionados.....	37
3.2.1.8.	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> de combinações dos compostos candidatos entre os fármacos utilizando metodologia de <i>checkerboarder</i>	37
3.2.1.9.	Avaliação da atividade dos novos compostos frente ao MTB persistente sem replicação, empregando MTB recombinante H ₃₇ Rv (pFCA-luxAB) e ensaio de recuperação com baixa oxigenação (LORA-Low Oxygen Recovery Assay).....	39
3.2.1.10.	Determinação do Espectro de Atividade.....	40
3.2.1.11.	Avaliação da Toxicidade Aguda dos compostos em camundongos C57BL/6.....	41
3.2.1.12.	Determinação da dose de Tolerância Máxima <i>in vivo</i>	41
3.2.1.13.	Avaliação do potencial ativo dos novos compostos em camundongos BALB/c	42

	infectados com MTB Erdmann.....	
3.2.1.13.a	<i>Infecção</i>	42
3.2.1.13.b	<i>Controle de Qualidade (CQ)</i>	42
3.2.1.13.c	<i>Controles de Infecção</i>	43
3.2.1.13.d	<i>Tratamento</i>	43
3.2.1.13.e	<i>Avaliação da atividade dos complexos sobre os camundongos infectados</i>	44
3.2.1.14.	<i>Avaliação da biodisponibilidade oral, através do screening farmacocinético em camundongos C57BL/6</i>	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1.	Ensaios <i>in vitro</i>	46
4.1.1.	Determinação da CIM frente ao MTB H ₃₇ Rv em diferentes condições ambientais (normal; pH 6,0; 4% de ASB e 10% de SFB).....	46
4.1.1.1.	Construção de um painel com perfil de sensibilidade/resistência com 58 isolados clínicos sensíveis, mono e multidrogas resistentes (TB-MDR).....	48
4.1.1.2.	Determinação da atividade anti-MTB dos compostos frente a 25 isolados clínicos selecionados.....	54
4.1.1.3.	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> de combinações dos compostos candidatos entre os fármacos utilizando metodologia de <i>checkerboarder</i>	57
4.1.1.4.	Avaliação da atividade dos novos compostos frente ao MTB persistente sem replicação, empregando MTB recombinante H ₃₇ Rv (pFCA-luxAB) e ensaio de recuperação com baixa oxigenação (LORA-Low Oxygen Recovery Assay).....	58
4.1.1.5.	Determinação do espectro de atividade.....	59
4.1.1.6.	Determinação do espectro de atividade.....	59
4.2.	Ensaios <i>in vivo</i>	61
4.2.1.	Avaliação da Toxicidade Aguda dos compostos em camundongos C57BL/6.	61
4.2.2.	Tolerância <i>in vivo</i>	64
4.2.3.	Avaliação da potencialidade dos novos compostos em modelo de infecção aguda.....	65
4.2.4.	Avaliação da biodisponibilidade oral, através do <i>screening</i> farmacocinético em camundongos C57BL/6.....	66
4.2.5.	<i>Pipeline</i> : Pesquisa de novos fármacos anti-TB, Laboratório “Prof. Dr. Hugo David” FCFAR/UNESP Araraquara.....	69
4.2.5.1.	Parâmetros de permanência ou de exclusão dos compostos no pipeline.....	71
4.2.5.1.a	Screening.....	71
4.2.5.1.b	Ensaios pré-clínicos (<i>in vitro</i>).....	71
4.2.5.1.c	Ensaios pré-clínicos (<i>in vivo</i>).....	73
5.	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	CAPÍTULO II	83
	PUBLICAÇÕES REFERENTES AO TRABALHO	84
	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO DO DOUTORADO	108

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A história do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) como o principal agente da tuberculose (TB) é de uma época remota. Fragmentos da coluna vertebral de múmias egípcias de 2400 A.C. (Antes de Cristo) apresentam definitivos sinais patológicos de decadência tuberculosa (TRIPATHI et al. 2005). Desde aquele tempo até hoje, milhões de pessoas morreram da doença e apenas alguns fármacos são ativos contra o bacilo. Os dados atuais mostram uma doença antiga, mais prevalente no mundo hoje do que em qualquer outra época da história humana (KOUL et al. 2011). Anualmente, a TB é responsável pela morte de dois a três milhões de pessoas em todo o mundo e perdas econômicas globais em torno de U\$ 12 bilhões (MA et al. 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente, 9,2 milhões de pessoas evoluem para TB doença anualmente em todo o mundo, representando 22 mil indivíduos doentes por dia. Desses, 80% se localizam em 22 países sub-desenvolvidos ou emergentes, nos quais o Brasil encontra-se hoje na 16ª posição. A evolução da doença tem causado 1,7 milhões de mortes anuais sendo 200 mil referente a co-infecção TB/HIV. Outro dado assustador são os números de casos de TB multi droga resistente (TB-MDR), com a notificação de 500 mil casos anuais (WHO, 2008).

Soma-se a esses dados, o fato de 1/3 da população mundial estar infectada com MTB em estado de latência servindo como um reservatório para a TB ativa. (MA et al. 2010).

A rifampicina (RMP), descoberta há mais de 50 anos atrás, representa o último fármaco introduzido dentro da primeira linha de tratamento da TB. Juntamente com isoniazida (INH), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), a RMP faz parte de um regime de tratamento de 6 meses sendo ineficaz contra TB-MDR e TB

extensivamente droga resistente (TB-XDR). Além disso, a interação medicamentosa entre RMP e anti-retrovirais compromete a eficácia terapêutica do tratamento de pacientes co-infectados com HIV (GANDHI et al. 2010).

1.1. Aspectos biológicos do MTB e aspectos relacionados à resistência aos fármacos

MTB possui uma parede celular espessa, rica em lipídeos, sendo uma bactéria de crescimento lento com tempo de duplicação médio entre 18-48 horas, dependendo da concentração de O₂, pH e nutrientes disponíveis. Quando corada com fucsina pela técnica de Ziehl Neelsen, as micobactérias não são descoradas mesmo tratadas com álcool e ácido clorídrico, sendo assim classificadas como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Essa característica de ácido resistência é devido ao alto conteúdo de ácidos micólicos, uma longa cadeia cruzada de ácidos graxos e outros lipídeos na parede celular (DAFFE e DRAPER, 1998). Os ácidos micólicos estão ligados à arabinogalactana que por sua vez se ligam aos peptídeoglicanos e parecem desempenhar um papel importante na virulência do MTB (MEENA e RAJNI, 2010). A resistência natural do MTB aos fármacos hidrofílicos e a desidratação é um exemplo da ação protetora desempenhada pelos ácidos micólicos e pela espessa parede celular rica em lipídeos.

Uma consideração importante quanto ao aspecto biológico e ao tratamento da TB é o fato de que o agente etiológico tem a capacidade de persistir intracelularmente em macrófagos do hospedeiro por longos períodos (SNEWIN et al. 1999). Uma terapia eficiente, portanto, depende da capacidade do novo fármaco erradicar a micobactéria dentro dos macrófagos (MA et al. 2010). Este fato torna-se ainda mais importante quando se considera a capacidade do MTB em permanecer

em estado de dormência, originando um grande grupo de indivíduos infectados que carregam o microrganismo em um estado sub-clínico, sem doença ativa (BAPELA et al. 2006). Após a inalação do bacilo em núcleos de gotículas, cerca de 10 a 30% das pessoas infectadas adoecem; outras 60-90% apesar de terem sido infectadas desenvolverão resposta imune celular eficaz para conter a infecção com sucesso. Os bacilos rodeados por células T e macrófagos não podem se reproduzir e adquirem estado de latência. Nesta fase os bacilos não são infecciosos. O MTB latente espera pacientemente pela oportunidade de desenvolver a doença e, finalmente, pela persistência vence a batalha contra a resposta imunológica humana (MANABE e BISHAI, 2000).

As micobactérias podem se utilizar de vias bioquímicas diferentes para escapar da ação letal dos compostos: (i) diminuição do acúmulo intracelular do fármaco por uma alteração da permeabilidade da membrana ou da parede, (ii) inibição ou alteração do alvo por mutação ou modificação na estrutura das enzimas. A coexistência desses mecanismos no mesmo hospedeiro pode levar a TB-MDR e XDR (DEPARDIEU et al. 2007).

Estudos recentes também têm associado essa resistência bacteriana ao sistema de bomba de efluxo. O efluxo é o bombeamento de saída de um soluto de uma célula (ROSSI et al. 2006). A resistência antimicrobiana em decorrência do efluxo se deve a um dos dois mecanismos: (i) aumento da expressão da proteína de bomba de efluxo ou (ii) aumento da eficiência de proteína na exportação do fármaco (PIDDOCK 2006). Genes que codificam a expressão das bombas de efluxo em MTB podem ser encontrados nos cromossomos e trabalham em sinergismo para aumentar a resistência natural (HEYM et al. 1994). Assim, as proteínas relacionadas

com bomba de efluxo podem ser alvos para novos fármacos contra o MTB (LOMOVSKAYA e BOSTIAN, 2006).

1.2. Tratamento

A capacidade do MTB em persistir no hospedeiro dificulta o tratamento, e mesmo os fármacos que são bactericidas eficazes *in vitro* requerem administração prolongada.

A quimioterapia da TB teve início em 1944. A estreptomicina (EST) (**Figura 2**) foi o primeiro fármaco realmente eficaz contra a TB. Possui valor de CIM de 1 µg/mL e meia-vida de 5-7 horas (HUNTER et al. 2008). Os compostos conhecidos como "fármacos de primeira linha", incluem a INH, EMB, PZA e RMP (**Figura 1**).

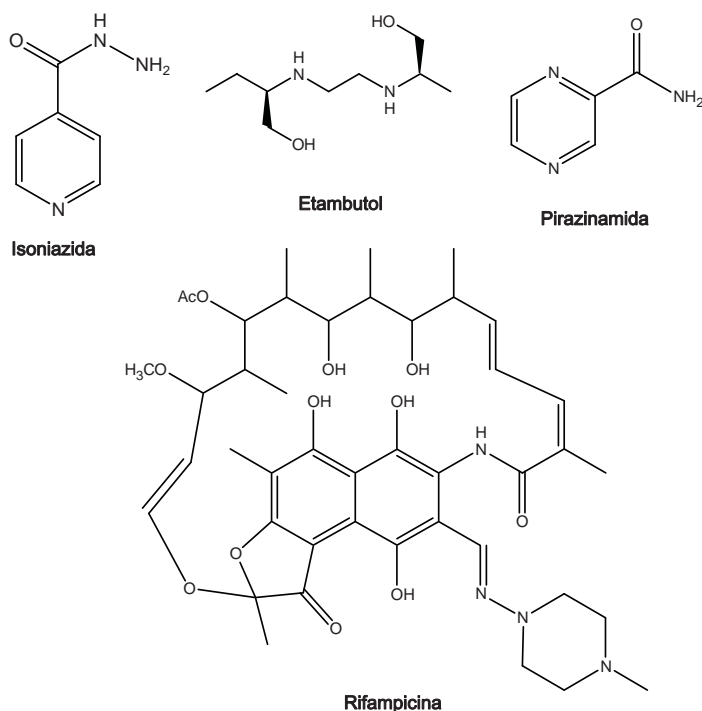


Figura 1. Fármacos de primeira escolha contra TB

Fármacos de “segunda linha” como EST, Ofloxacino (OFX), Terizidona (TRZ), etionamida (ETM), cicloserina (CS), ácido para-aminossalicílico (PAS), tiacetazona

(TCT), clofazimina (CLF) e alguns tipos de canamicinas (CM) são usados quando os medicamentos de primeira escolha não são efetivos (**Figura 2**) (LALLOO e AMBARAM, 2010).

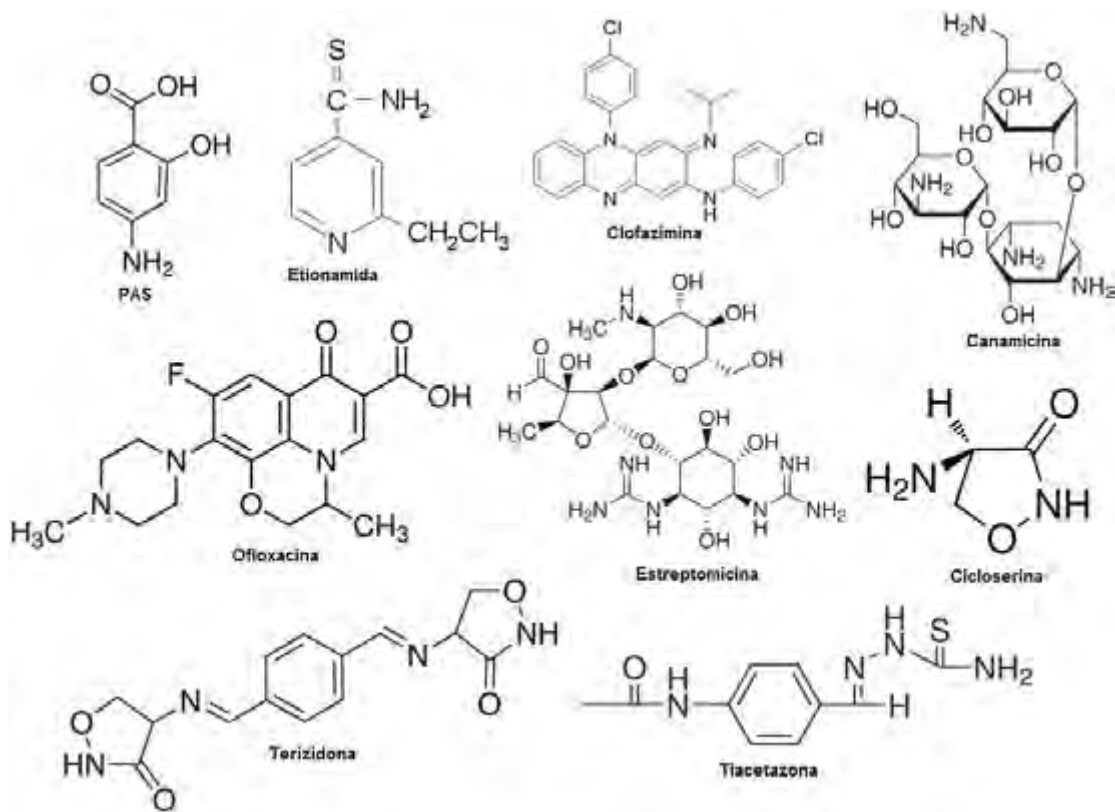


Figura 2. Fármacos de segunda escolha contra TB

A quimioterapia atual da TB é dependente dos fármacos que inibem o metabolismo bacteriano, com uma forte ênfase na inibição da síntese da parede celular (YING 2005; ROSSI et al. 2006). De acordo com o seu modo de ação, os medicamentos de primeira e segunda linha contra TB também podem ser agrupados como inibidores da parede celular (INH, EMB, ETM e CS), inibidores da síntese de ácidos nucleicos (quinolonas), inibidores da síntese de proteínas (RMP, EST e CM) e inibidores do metabolismo energético de membrana (PZA) (YING 2005). Os fármacos atuais são, portanto, capazes de agir em bactérias na fase de crescimento

ativo através da inibição de processos celulares, tais como biogênese da parede celular e replicação do DNA (Medecins San Frontieres, 2006). Isto implica que a quimioterapia atual é caracterizada por uma atividade bactericida eficiente, mas uma atividade extremamente fraca de esterilização, esta última definida como a habilidade para eliminar bactérias de crescimento lento ou de metabolismo lento, que persistem após a morte das bactérias que estavam na fase de multiplicação exponencial (MITCHISON 1980). A fraca propriedade esterilizante dos medicamentos de TB disponíveis é um dos principais inconvenientes da quimioterapia atual.

1.2.1. Tratamento no Brasil

A atual terapêutica recomendada pelo Ministério da Saúde no Brasil contra TB pulmonar ativa, preconiza 2 esquemas de tratamentos: regime básico e regime TB-MDR e XDR. O regime básico é destinado aos pacientes diagnosticados com infecção sensível aos fármacos de 1ª linha. Considera-se como TB-MDR o paciente com infecção resistente pelo menos aos fármacos INH e RMP. Enquanto que TB-XDR refere-se à infecção resistente a INH, RMP como também as fluoroquinolonas e a um dos seguintes injetáveis: CM, amicacina ou capreomicina (GOLDMAN et al. 2007).

O regime básico divide-se em 2 fases:

- Fase intensiva: 2 meses – RMP, INH, EMB e PZA.
- Fase de manutenção: 4 meses – RMP e INH.

O regime MDR e XDR-TB divide-se em 3 fases:

- Fase intensiva (1º estágio (5 doses semanais): 2 meses – EMB, PZA, EST, OFX e TRZ.

- Fase intensiva (2º estágio (3 doses semanais): 4 meses - EST, EMB, PZA, OFX e TRZ.

- Fase de manutenção (12 meses) – EST, OFX e TRZ (CONDE et al. 2009).

1.3. Abordagens para pesquisa de um novo fármaco

O investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos tem aumentados substancialmente nas últimas décadas, entretanto o número anual de novos fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* E.U.A. (FDA) não aumentou em conformidade (MUNOS 2009). Alguns autores sugerem que a pesquisa de novos fármacos através da seleção de alvos, ou seja, pela abordagem de pesquisa utilizando um único alvo enzimático pode ser um dos principais determinantes da baixa produtividade em P&D nos últimos anos (SWINNEY e ANTHONY, 2011).

Fatos como a falta de novos fármacos anti-TB desde 1960, fracasso do tratamento atual contra MDR e XDR-TB e maior investimento em P&D, vem despertando o interesse de muitos grupos de pesquisa no desenvolvimento de estratégias para identificar novos fármacos contra TB. Essas abordagens seguem dois caminhos distintos: seleção baseada em um único alvo (*Target-based screening*) e seleção fenotípica (*Phenotypic screening*), ambos com suas vantagens e desvantagens (KOUL et al. 2011; SWINNEY e ANTHONY, 2011).

Devido à disponibilidade do genoma completo do MTB (COLE et al., 1998), as empresas farmacêuticas e instituições de pesquisas responsáveis pela maior parte do investimento em P&D, têm investido na abordagem baseada na seleção de um único alvo. No entanto, segundo a literatura, essa abordagem têm apresentado pouco sucesso (PAYNE et al. 2007; KOUL et al. 2011). Um dos alvos mais

estudados na busca de novos fármacos anti-TB é o grupo das isocitrato liases. Essas enzimas são essenciais para a multiplicação das bactérias no interior dos macrófagos e de sua persistência em longo prazo. No entanto, as pesquisas buscando inibidores deste alvo foram descontinuadas devido à falta de atividade na célula bacteriana (Working groups on new anti TB drugs, 2011). Mesmo quando é descoberto um inibidor da enzima bacteriana, a questão de sua atividade na complexa célula micobacteriana continuará sem resposta, sendo este o maior desafio e motivo de insucesso neste tipo de abordagem (PAVAN et al. 2011).

Em relação aos ensaios fenotípicos, a história mostra que os primeiros fármacos foram descobertos por acaso ou com estudos biodirigidos utilizando células inteiras como modelo experimental. Esta estratégia identificou todos os compostos atualmente empregados na terapêutica de primeira escolha, RMP, INH, EMB e PZA (Handbook of anti-tuberculosis agents, 2008).

Pela primeira vez em décadas, 5 novas classes de compostos sintéticos orgânicos estão presentes em diferentes estágios de triagem clínica, tendo como principais representantes: SQ-109 (Sequella Inc.), OPC-67583 (Otsuka Pharmaceutical Company), LL3858 (Lupin Ltd), TMC 207 (Johnson & Johnson) e PA-824 (TB Alliance and Novartis) (LALLOO e AMBARAM, 2010; LIENHARDT et al. 2010). Curiosamente, todos esses compostos são originários de fármacos conhecidos e que foram modificados, ex.: SQ-109 é originário do EMB; OPC-67583 é originário do metronidazol e todos foram identificados através de abordagens fenotípicas, sugerindo que a estratégia de *screening* com base em células inteiras apresenta maior sucesso do que a abordagem baseada em um único alvo (KOUL et al. 2011). Entretanto, a carência em estruturas químicas inéditas permanece e apesar da possibilidade da entrada de novos medicamentos, o desenvolvimento de

novos fármacos contra TB ainda é insuficiente para resolver as necessidades não atendidas do tratamento (MA et al. 2010).

Há, portanto, uma necessidade premente de novos agentes antimicobacterianos com características adequadas de eficácia e segurança associados à conveniência terapêutica. Assim, espera-se que um novo fármaco ideal possa: (i) reduzir a duração do tratamento; (ii) ter atividade contra cepas resistentes; (iii) não interferir com outros fármacos como os anti-retrovirais e (iv) ter atividade contra os bacilos em estado de latência (MA et al. 2010).

Na descoberta de novos agentes anti-TB, utilizando abordagem fenotípica, duas principais linhas tem sido empregadas (SRIRAM et al. 2006). Uma delas é baseada na síntese de análogos de drogas existentes com o objetivo de reduzir e melhorar o tratamento da TB. A outra envolve a busca de novas estruturas (Figura 3) com as quais a micobactéria nunca tenha sido apresentada antes (TARALLO et al. 2010).

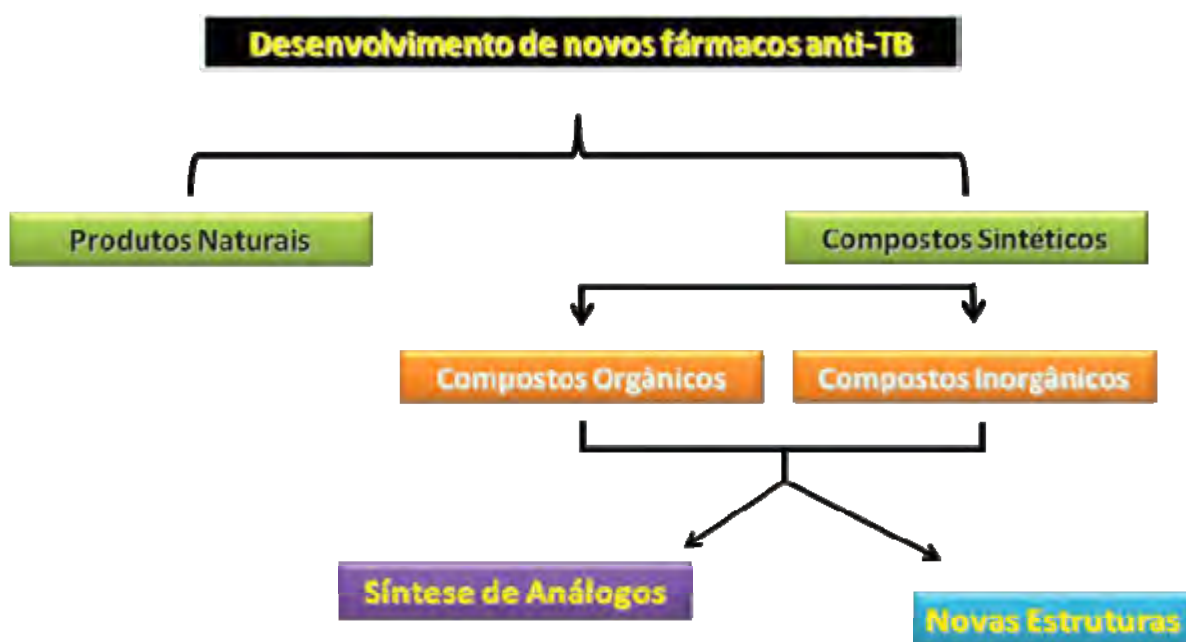


Figura 3. Desenvolvimento de novos fármacos anti-TB

1.4. Potencialidade dos compostos de coordenação com metais no tratamento da TB

A química medicinal inorgânica mostra ser uma ferramenta em potencial para minimizar os problemas de tratamento da TB. É sabido que muitos elementos metálicos desempenham papel crucial em sistemas vivos (OLIVEIRA et al. 2006). Considerando que os íons metálicos são deficientes em elétrons, e que a maioria das moléculas biológicas, tais como proteínas e DNA são ricos em elétrons, a atração destas cargas opostas leva a uma tendência geral dos íons metálicos em se ligar e interagir com essas moléculas biológicas. A relação estrutura-atividade (REA) entre os complexos e os ligantes livres evidencia que a complexação com o metal pode aumentar a atividade antimicrobiana do ligante, principalmente se este já for um fármaco, e também indica que o metal desempenha por si só um papel relevante (BERNHARDT et al. 2008; ZHANG et al. 2011). O aumento da atividade dos complexos pode ser explicado também com base no conceito de Overtone e na teoria da quelação de Tweedy (TWEEDY e TURNER, 1965; DHARMARAJ et al. 2001). De acordo com o conceito de Overtone sobre permeabilidade celular, a membrana lipídica que envolve a célula favorece a passagem apenas de materiais lipossolúveis o que faz a lipossolubilidade um fator importante no controle da atividade antimicrobiana. Na teoria da quelação de Tweedy, a polaridade do íon metálico é reduzida em maior grau devido à sobreposição dos orbitais do ligante e o compartilhamento parcial da carga positiva do íon metálico com os grupos doadores. Além disso, a deslocalização de elétrons- π sobre o anel quelato é aumentada, o que, conseqüentemente, aumenta a lipossolubilidade dos complexos no organismo. Estes complexos também perturbam o processo de respiração das células e, assim,

bloqueiam a síntese das proteínas que restringem ainda mais o crescimento do organismo e como resultado, os microrganismos morrem.

1.4.1. Rutênio (Ru)

Assim como o Ferro, a maior parte da atividade biológica do rutênio ocorre com estado de oxidação +II e +III. Muitos complexos de Ru foram desenvolvidos como agentes anti-câncer. Os compostos de Ru representam uma alternativa interessante para substituir os de platina, como a cisplatina, com menor toxicidade e maior atividade (LEBWOHL e CANETTA, 1998; WONG e GIANDOMENICO, 1999). Os complexos de Ru também têm sido avaliados como potenciais agentes contra uma série de bactérias. Em alguns casos foi demonstrado que tais complexos contendo fármacos (antibióticos) como ligantes orgânicos podem superar a resistência desenvolvida pelas bactérias para os ligantes livres sozinhos (NAVARRO et al. 1998; SHAIENDRA et al. 2001). No entanto, só recentemente foram descritos alguns compostos de Ru com propriedade anti-TB.

A primeira publicação, em 2008 (NASCIMENTO et al. 2008), mostrou a atividade antimicobacteriana dos complexos de Ru(II) com fórmula geral $[Ru(SpymMe_2)(dppb)(N-N)]PF_6$, N-N = bipy (**4a**) e Me-bipy (**4b**) (**Figura 4**) e seus precursores *cis*- $[RuCl_2(dppb)(N-N)]$, N-N = bipy (**7c**) e Me-bipy (**4d**) em ensaios preliminares *in vitro* contra MTB H₃₇Rv. Os compostos **4a** e **4b** exibiram atividade promissora, com valores de CIM de 0,80 e 0,78 μ M respectivamente. Os precursores **4c** e **4d** (CIM = 5,17 e 7,99 μ M, respectivamente) foram menos ativos, enquanto os ligantes livres apresentaram valores elevados de CIM.

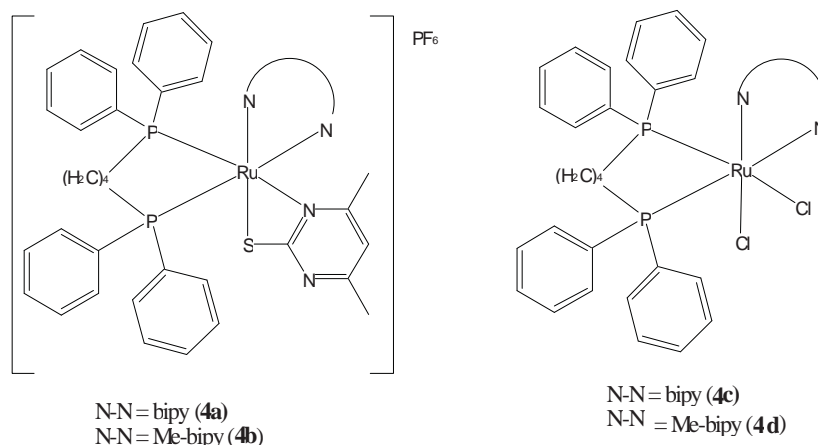


Figura 4. Primeiros compostos de Ru(II) ativos contra MTB

Na sequência, foram descritas as propriedades anti-MTB *in vitro* dos complexos *cis*-[RuCl₂(dppm)₂] (**5a**) e *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] (**5b**), e dos complexos de Ru(II) com fosfina e picolinato como ligantes (**5c**) e (**5d**) (PAVAN et al. 2010). Os complexos **5c** e **5d** apresentaram CIM de 0,69 e 0,22 μM, respectivamente, o que representa um incremento notável na atividade quando comparado com as fosfinas livres. A atividade foi atribuída à natureza dos quelatos dos complexos que resultou na baixa labilidade, proporcionando um transporte seguro do ligante até o sítio de interação com o microrganismo. Outra constatação importante, foi verificada quanto ao aumento da atividade dos compostos catiônicos **5c** e **5d** em relação ao complexo neutro derivado da trifenilfosfina **5e** e o precursor *cis*-[RuCl₂(P-P)]. Pode-se supor que o caráter catiônico dos complexos **5c** e **5d** facilitaram a sua absorção pela bactéria.

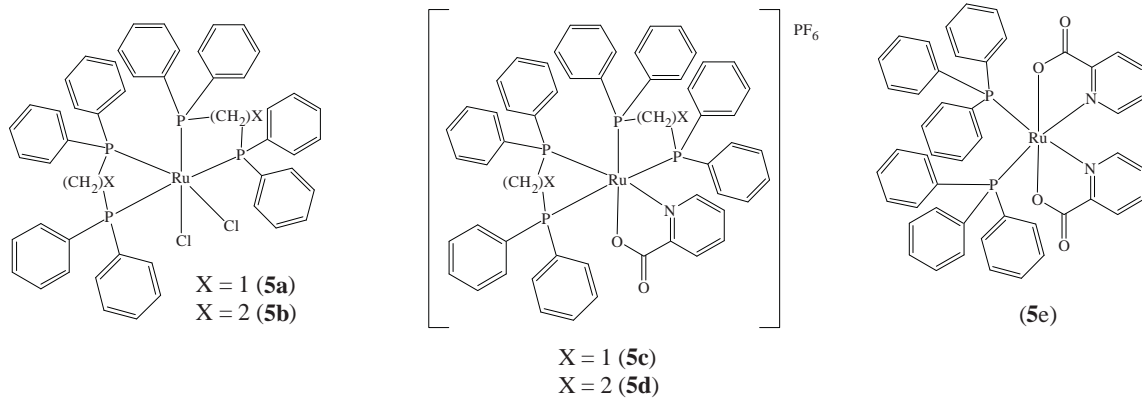


Figura 5. Complexos de Ru(II) com fosfina e picolinato como ligantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo do projeto foi desenvolver um fluxograma (*pipeline*) com ensaios fenotípicos rápidos, sensíveis, específicos e de baixo custo na pesquisa de um novo fármaco contra TB. Paralelamente, determinou-se o perfil pré-clínico *in vitro* e *in vivo* de seis novos complexos heterolépticos de Ru(II) com fosfinas, diiminas e picolinato como ligantes, candidatos a agentes anti-TB frente a esse *pipeline*. Os complexos foram totalmente caracterizados quimicamente, e selecionados racionalmente a partir das atividades biológicas promissoras, como a atividade intra e extra celular contra MTB, e baixa citotoxicidade (IC₅₀).

2.2. Específicos

2.2.1. Determinação da CIM dos novos compostos utilizando *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) frente ao MTB H₃₇Rv em condição normal e em 3 diferentes situações: pH 6,0; concentração de 4% de Albumina de Soro Bovino (ASB) e 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB).

2.2.2. Construção de um painel com perfil de sensibilidade/resistência envolvendo 58 isolados clínicos (sensíveis, mono e multidrogas resistentes), através da técnica do REMA.

2.2.3. Determinação da atividade anti-MTB dos compostos frente aos 25 isolados clínicos selecionados do painel, com perfil de sensibilidade/resistência.

2.2.4. Avaliação da atividade *in vitro* de combinações dos compostos candidatos entre os fármacos INH, RMP, EST, EMB e MOX utilizando metodologia de *checkerboarder*.

2.2.5. Avaliação da atividade dos novos compostos frente ao MTB persistente sem replicação, empregando MTB recombinante H₃₇Rv (pFCA-luxAB) e ensaio de recuperação com baixa oxigenação (LORA-*Low Oxygen Recovery Assay*).

2.2.6. Determinação do espectro de atividade dos novos compostos frente as espécies *M. smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

2.2.7. Avaliação da toxicidade aguda dos compostos em camundongos C57BL/6.

2.2.8. Determinação da dose de Tolerância Máxima *in vivo*.

2.2.9. Avaliação do potencial ativo dos novos compostos em camundongos BALB/c infectados com MTB Erdmann.

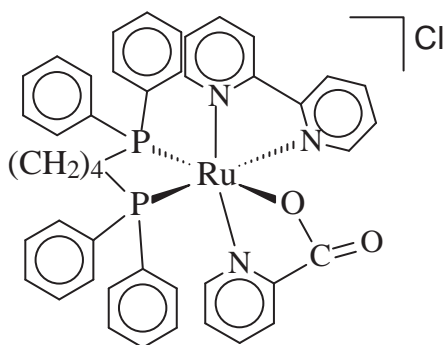
2.2.10. Avaliação da biodisponibilidade oral, através do *screening* farmacocinético em camundongos C57BL/6.

3. MATERIAL E MÉTODOS

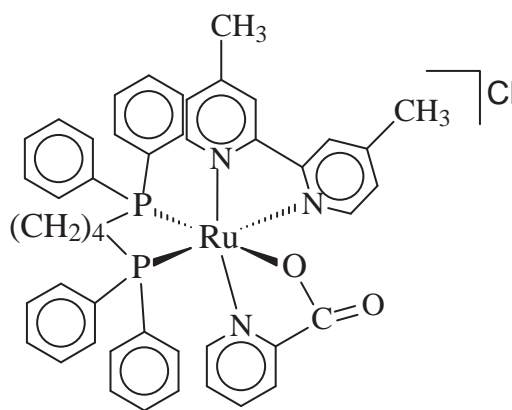
3.1. MATERIAL

3.1.1. Síntese das amostras

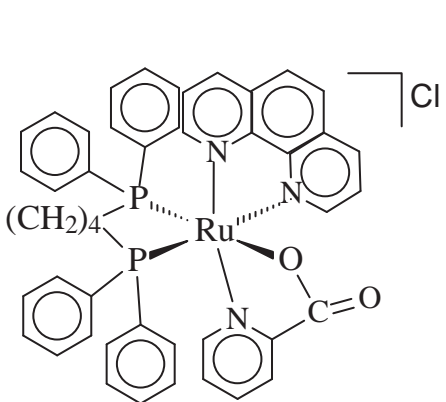
Os complexos Ru(II) fosfinas/diiminas, [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (**SCAR1**), [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (**SCAR2**), [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (**SCAR4**), *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**SCAR5**), *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (**SCAR6**), Ru(pic)(dppe)(phen) (**SCAR7**), foram sintetizados e caracterizados pelo grupo do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, do Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.



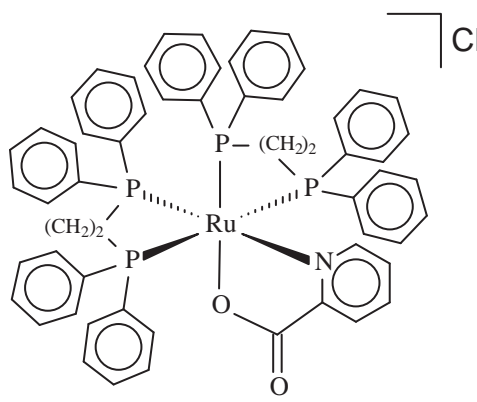
SCAR 01



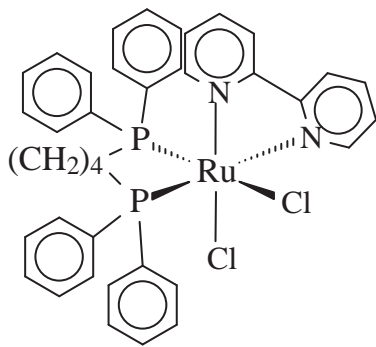
SCAR 02



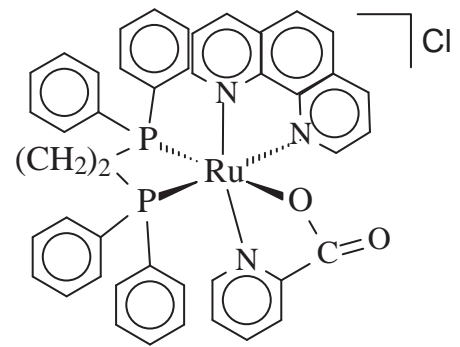
SCAR 04



SCAR 05



SCAR 06



SCAR 07

Figura 6. Estrutura dos complexos SCAR

3.1.2. Fármacos de Referência

Foram utilizadas soluções estoque de concentrações 10 mM dos fármacos INH, RMP, EST, EMB, MOX, gentamicina (GTM), metronidazol (MET) e CM (Sigma[®]); nitroimidazol PA-824 (TB Alliance e Novartis); diarilquinolina TMC-207 (Johnson & Johnson).

3.1.3. Solução para revelação

Para os ensaios de fluorescência foi empregada a Resazurina (Aldrich[®]) na concentração de 0.01% em água destilada estéril. Para os ensaios de luminescência foi utilizado *n*-decanal aldeído (Sigma[®]) na concentração de 1% em etanol.

3.1.4. Isolados clínicos de MTB sensíveis, mono e MDR-TB

Os isolados clínicos foram cedidos por Dr. Fernando Augusto Fiúza de Melo do Instituto Clemente Ferreira de São Paulo. Todos os isolados já vieram com o perfil de sensibilidade/resistência para os fármacos INH, RFP, EST e EMB, determinado pelo sistema automatizado BACTEC[™] MGIT[™] 960 utilizando o SIRE Kit (BD[®]), seguindo recomendações do fabricante com as seguintes concentrações

críticas para os fármacos: INH (0,1 µg/mL), RFP (1,0 µg/mL), EST (1,0 µg/mL) e EMB (5,0 µg/mL).

3.1.5. Cepas Padrão

As cepas padrão abaixo foram utilizadas, sendo mantidas a -80 °C em solução salina tamponada com fosfato a 1% em pH ≈ 7,0 (PBS) até o momento do uso.

MTB H₃₇Rv ATCC 27294; MTB recombinante H₃₇Rv ATCC 27294 (pFCA-luxAB) e MTB Erdmann; *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922), *C. albicans* (ATCC 10231) and *M. smegmatis* luxAB (MC²155).

3.1.6. Animais de Experimentação

Para os ensaios de toxicidade aguda foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, pretos, com idade entre 8-10 semanas, com peso médio de 15-20 gramas procedentes do CEMIB/UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório). O manuseio dos animais teve aprovação prévia do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP (CEP/FCF/CAr. n° 41/2008).

Para os ensaios de tolerância e avaliação da atividade *in vivo* foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, brancos com idade entre 8-10 semanas, com peso médio de 15-20 gramas seguindo as recomendações do comitê de ética da *University of Illinois at Chicago* sob responsabilidade do *Institute for Tuberculosis Research*.

3.1.7. Parque de Equipamentos

O equipamento *Precision XS Microplate Sample Processor* (Biotek[™]) foi utilizado para a realização de todas as microdiluições. O leitor de microplacas SPECTRAFLUOR (Tecan[®]) foi utilizado para avaliação dos ensaios de absorvância (492 nm) e aqueles que utilizaram a resazurina com filtros de excitação/emissão de 530/590 nm respectivamente. Para a metodologia do LORA a avaliação da luminescência foi realizada através do leitor de microplacas Victor² (PerkinElmer[®]). Para os ensaios do LORA, a condição de anaerobiose (oxigênio <0,16%) foi alcançada utilizando o equipamento Anoxomat modelo WS-8080 (MART *Microbiology*) com 2 ciclos de evacuação e preenchimento com uma mistura de 10% H₂, 5% CO₂, e N₂ balanceado.

A infecção dos camundongos com MTB Erdmann foi realizada através do sistema de exposição e inalação modelo 099C A4212 *Inhalation Exposure System* 120V, 60Hz. AC (Glas-Col[®]).

3.2. METODOLOGIAS

3.2.1. Preparo das suspensões bacterianas

3.2.1.1. MTB H₃₇Rv (ATCC 27294), MTB Erdmann (ATCC 35801)

Todas as cepas foram cultivadas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco[™]) enriquecido com OADC (BD/BBL[®]) e incubadas por aproximadamente 10 dias a 37°C até obtenção de uma grande quantidade de massa bacilar. Na sequência, foi realizada colheita da suspensão de micobactérias e lavagem com PBS, acrescido de Tween 80 à 0,05% através de centrifugação por 15 minutos a 3150 g (≈3000 rpm) por 2 vezes. O sedimento obtido foi ressuscitado em 50 mL do mesmo tampão.

Essa suspensão foi alíquotada em microtubos e congelada a -80°C . O controle de qualidade (CQ) da viabilidade celular foi realizado após congelamento de no mínimo 2 dias. Após este período, semeou-se 100 μL da suspensão pura e das diluições: 10^1 , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} em placas de 3 quadrantes contendo meio Middlebrook 7H11 (Difcotm) acrescido de 10% de OADC. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por até 20 dias para a realização da contagem das unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL).

3.2.1.2. Preparo da suspensão bacilar de MTB recombinante H₃₇Rv ATCC 27294 (pFCA-luxAB) – Modelo de Wayne.

A cepa de MTB H₃₇Ra (pFCA-luxAB) descrita foi cultivada em frascos de nephelo contendo 660 mL de caldo Dubos (Difcotm) suplementado com albumina bovina (Difcotm) e CM na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ sob agitação contínua de 120 rpm utilizando barra magnética sem perturbação da superfície do meio de cultura. O frasco foi vedado completamente e a cultura incubada a 37°C . A densidade óptica (D.O.₅₈₀) da cultura foi acompanhada diariamente. Em aproximadamente 10 dias ocorreu a depleção de O_2 dissolvido no meio (1% de saturação) levando a uma condição de microaerofilia onde a replicação bacilar diminuiu abruptamente entrando na fase persistente sem replicação I (PSR I), entretanto, a D.O.₅₈₀ continuou aumentando a uma taxa muito reduzida. Ao completar aproximadamente 15 dias a concentração de O_2 diluído estava em torno de 0,06% o que confere uma condição praticamente de anaerobiose. Nestas condições, a célula bacteriana para de se replicar totalmente, observada pela constância na taxa de D.O.₅₈₀, entrando na fase PSR II (WAYNE e HAYES, 1996; WAYNE e SOHASKEY, 2001). Nesta fase foram

realizadas a colheita, a lavagem e o congelamento da suspensão bacilar. Em seguida determinou-se o CQ com adição de CM aos meios de cultura (item **3.2.1.1.**).

3.2.1.3. *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922) e *C. albicans* (ATCC 10231)

As cepas de *S. aureus* e *E. coli* foram cultivadas em caldo Mueller Hinton com ajuste de cátion (CAMH) (Difco™) por aproximadamente 16-20 horas a 37°C e *C. albicans* em meio RPMI-1640 (ATCC™) por aproximadamente 48-72 horas a 37°C. Na sequência foi avaliado o CQ (item **3.2.1.1.**).

3.2.1.4. *M. smegmatis* (ATCC 700084)

As suspensões foram preparadas de acordo como descrito no item **3.2.1.1.** com alteração apenas do período de incubação para 3 dias nos meios líquidos e sólidos.

3.2.1.5. Determinação da CIM frente ao MTB H₃₇Rv em diferentes condições ambientais (normal; pH 6,0; 4% de ASB e 10% de SFB)

A CIM foi determinada empregando a metodologia descrita por Collins e Franzblau, (1997) denominada MABA. Soluções estoque dos compostos foram preparadas em dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma®) e diluídas em caldo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, para obter a concentração final de cada composto no intervalo de 0,078 a 10 µM. Uma alíquota da cultura de MTB H₃₇Rv (item **3.2.1.1.**) foi descongelada e adicionada a microplaca de 96 orifícios juntamente com os compostos permitindo um volume final de 200 µL com 2x10⁴ UFC/mL. Na sequência, a microplaca foi incubada por 7 dias a 37°C com 5% CO₂ e então foram aplicados 25 µL de Alamar Blue em cada orifício (item **3.1.3.**) e a placa foi incubada por 24 h. A

fluorescência foi medida e a CIM definida como a menor concentração do composto resultando na inibição $\geq 90\%$ da multiplicação microbiana. O estudo foi estendido empregando três outras condições que consistiram em: ajuste do meio de cultura para pH 6; introdução de ASB na concentração de 4% ou de SFB de 10% no meio de cultura. Como controles, as CIMs da RFP e INH foram determinadas em cada ensaio. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

3.2.1.6. Construção de um painel com perfil de sensibilidade/resistência envolvendo 58 isolados clínicos (sensíveis, mono e multidrogas resistentes)

O valor de CIM dos fármacos (INH, RFP, EST e EMB) para os isolados clínicos foi determinado segundo Luna-herrera et al., (2003), modificando a técnica do MABA pela do REMA (PALOMINO et al. 2002). O cultivo do MTB mono e/ou MDR (item 3.1.4.) foi obtido em 7 a 10 dias de incubação em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e adicionado com Tween 80 para evitar a formação de grumos. Suspensões das bactérias foram preparadas e comparadas visualmente e por absorbância com filtro de referência de 492 nm com a utilização do equipamento descrito no item 3.1.7. com a escala turbidimétrica de McFarland nº 1 (escala padrão). Após o acerto da turbidez, a suspensão foi diluída de 1:25 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e o inóculo foi adicionado em cada orifício da microplaca de 96 orifícios (TPP®) onde já se encontravam diluídos os fármacos a serem analisados. Os experimentos foram realizados em triplicata. As microplacas foram incubadas por 7 dias a 37°C quando foi adicionada a solução de resazurina (item 3.1.3.) e realizada incubação a 37°C por mais 24 h, seguida de leitura (item 3.1.7.) e cálculo da CIM (item 3.2.1.5.). A determinação do “*breakpoint*” para cada composto foi baseada na interpretação da curva ROC (*Receiver Operating*

Characteristic) (ZWEIG e CAMPBELL, 1993) utilizando o software MedCalc (Mariakerke, Bélgica) que forneceu o correspondente *cut-off* e avaliou a performance do teste utilizando as características de sensibilidade e especificidade e o cálculo da área sob a curva (ASC).

3.2.1.7. Determinação da atividade anti-MTB dos compostos frente aos 25 isolados clínicos selecionados do painel, com perfil de sensibilidade/resistência

Valores de CIM dos compostos **SCAR** frente ao painel de isolados clínicos sensíveis, mono-resistentes e MDR-TB foram determinados empregando a metodologia de Luna-herrera et al., (2003) e descrita no item **3.2.1.6**.

3.2.1.8. Avaliação da atividade *in vitro* de combinações dos compostos candidatos e dos fármacos da terapêutica utilizando metodologia de checkerboarder

A interação entre os compostos **SCAR** e os fármacos utilizados no esquema terapêutico atual (INH, RMP, EST, EMB e MOX) foi avaliada frente ao MTB H₃₇Rv, de acordo com a metodologia sugerida por Luna-herrera et al., (2007) com algumas modificações baseadas na metodologia descrita por Moody, (1992). Para o ensaio de *checkerboarder* de duas dimensões (2D) foram utilizadas microplacas estéreis de 96 orifícios (TPP®) e as diluições seriadas foram realizadas utilizando o equipamento *Precision XS Microplate Sample Processor (Biotek™)* (item **3.1.7.**). O complexo teste **(A)** foi dispensado na fileira A (eixo X) de 2-9, na concentração 4 vezes superior ao CIM sozinho e realizado diluições seriadas até a fileira H atingindo concentração 32 vezes inferior ao CIM. O fármaco cuja interação deveria ser observada **(B)**, foi

dispensado na coluna 2 (eixo Y) de A-H, na concentração 4 vezes superior ao CIM sozinho, realizada diluições seriadas até a coluna 9, atingindo concentração 32 vezes inferior ao CIM. A coluna 10 foi utilizada para controle de crescimento bacteriano, a coluna 11 de A-F foi utilizada para controle de esterilidade do meio de cultura e os poços 11G e 11H foram utilizados para controle de esterilidade do composto, sendo o complexo teste e o fármaco da terapêutica adicionados respectivamente nessa ordem (**Figura 7**). Após esse cruzamento de combinações, uma aliquota da cultura de MTB H₃₇Rv (**item 3.2.1.1.**) foi descongelada e adicionado 100 µL em cada orifício da microplaca permitindo um volume final de 200 µL e uma concentração bacilar inicial de 2x10⁴ UFC/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata. Paralelamente a este foi também realizado o ensaio de determinação da CIM de cada composto isoladamente. As microplacas foram seladas e incubadas por 7 dias a 37°C quando foi adicionada resazurina (**item 3.1.3**). Após a incubação a 37°C por 24 h, foi feita a leitura da fluorescência (**item 3.1.7.**). O resultado foi interpretado utilizando o cálculo de Concentração Inibitória Fracionada (CIF) (**esquema 1**), onde buscou-se o valor do menor CIF entre todos os orifícios que atingiram o valor de inibição combinado maior ou igual a 90% (Moody, 1992). Baseado no CIF, sinergismo foi considerado para valores ≤ 0,75, indiferença combinatória quando valores entre 0,75-4 e antagonismo com valores > 4 (Poeta et al., 2000).

$$\text{CIF} = \frac{\text{CIM [A] combinado}}{\text{CIM [A] sozinho}} + \frac{\text{CIM [B] combinado}}{\text{CIM [B] sozinho}} = \text{índice CIF}$$

Esquema 1: Cálculo da concentração inibitória fracionada (CIF)

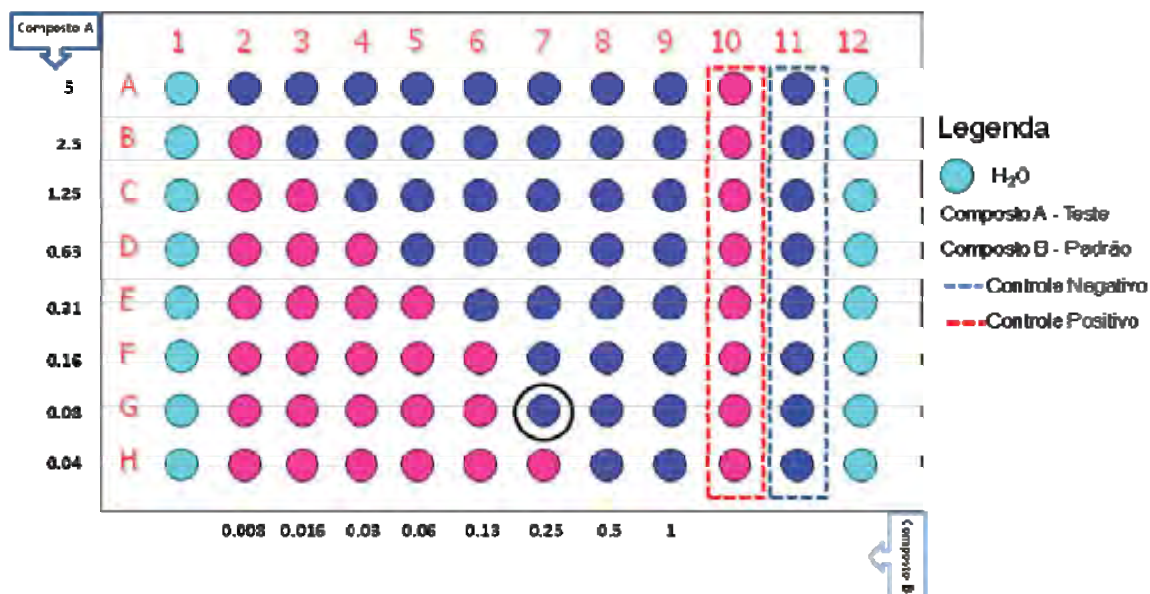


Figura 7. Checkerboarder 2D: Índice CIF = (CIM [A] combinado/CIM[A] sozinho) + (CIM [B] combinado/CIM [B] sozinho) = $\leq 0,75$ sinergismo; 0,75-4 neutro ou > 4 antagonismo. Círculo preto, exemplo de menor CIF. REMA: rosa=crescimento; azul=não crescimento.

3.2.1.9. Avaliação da atividade dos novos compostos frente ao MTB persistente sem replicação, empregando MTB recombinante H₃₇Rv (pFCA-luxAB) e ensaio de recuperação com baixa oxigenação (LORA-Low Oxygen Recovery Assay)

A atividade dos novos compostos contra MTB em estado de latência foi determinada através do ensaio de recuperação com baixa oxigenação (LORA-Low Oxygen Recovery Assay) (CHO et al. 2007). As soluções estoque dos compostos (item 3.2.1.5.) foram diluídas em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, para obter a concentração final de cada composto no intervalo de 0,078 a 10 μM . Uma alíquota da cultura de MTB H₃₇Rv (pFCA-luxAB) em estado de latência (PSR II) (item 3.2.1.2.) foi descongelada e adicionada à microplaca de 96 orifícios (NUNCtm), branca, juntamente com os compostos permitindo um volume final de 200 μL com 2×10^5 UFC/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata, as microplacas foram colocadas em jarras herméticamente fechadas acrescidas de um catalisador e

um indicador de anaerobiose (GasPak™). A condição de anaerobiose (oxigênio <0,16%) foi alcançada utilizando o equipamento Anoxomat modelo WS-8080 (MART Microbiology) com 2 ciclos de evacuação e preenchimento com uma mistura de 10% H₂, 5% CO₂, e N₂ balanceado (item 3.1.7.). As jarras foram incubadas a 37°C por 10 dias e então as placas foram retiradas das jarras e transferidas a um ambiente gasoso (condições ambientes) a 37°C por 28 horas para a “recuperação” do metabolismo bacteriano. Depois de 28 horas uma solução recém-preparada de 1% de n-decanal (item 3.1.3.) em etanol foi diluída 10X em PBS e adicionado 100 µL em cada poço e a luminescência avaliada. Compostos que reduziram a viabilidade da bactéria sob condições de PSR II levaram a uma diminuição no sinal da luciferase após recuperação aeróbia. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação de 90% das células de MTB em estado de latência.

3.2.1.10. Determinação do Espectro de Atividade

A atividade dos novos compostos frente ao *M. smegmatis* (item 3.2.1.4.) foi determinada utilizando o REMA (PALOMINO et al. 2002) como descrito no item 3.2.1.6. apenas com alteração no período de incubação de 7 para 3 dias. A CIM dos outros microrganismos (item 3.2.1.3.) foi determinada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; 2009), com preparação da microplaca de mesma forma como descrita no item 3.2.5.1. Uma alíquota de cada cultura foi descongelada e adicionada à microplaca de 96 orifícios juntamente com os compostos permitindo um volume final de 200 µL e concentração de 5x10⁵ UFC/mL para *S. aureus* e *E. coli* e 1,5x10⁶ UFC/mL para *C. albicans*. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h para *S. aureus* e *E. coli* e 48 h para *C. albicans*, a

absorbância determinada e a CIM calculada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.1.11. Avaliação da Toxicidade Aguda dos compostos em camundongos C57BL/6

O perfil de segurança dos compostos foi avaliado pelo ensaio de toxicidade aguda em camundongos de acordo com o estabelecido pelo OECD (*Organization for Economic Co-operation Development*) através do método clássico de toxicidade aguda (DL_{50}) por dose única via oral (gavagem) dos compostos (OECD, 2001). Cada composto teve como veículo água ou carboximetilcelulose a 0,5 % (CMC 0,5%) (Sigma[®]). Os compostos foram administrados em dose única na concentração de 2000 mg/Kg de peso corpóreo, por gavagem ($n=6$ animais/composto). Quando algum composto apresentou perda acidental de mais de 50% dos animais; doses de 1.000, 300 e 100 mg/Kg de peso corpóreo foram administradas. Os animais foram monitorados por 14 dias e foram avaliados os parâmetros comportamentais (*screening hipocrático*). Ao final do experimento os animais foram eutanasiados, os órgãos retirados cirurgicamente e analisados utilizando o software SigmaStat[®] 3.5 (Dundas software, Germany, 1999), por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey estabelecendo $P < 0,05$ como nível de significância.

3.2.1.12. Determinação da dose de tolerância máxima *in vivo*

Previamente à avaliação da eficácia *in vivo*, foram administrados em 2 camundongos via gavagem, doses diárias dos compostos por ciclos de cinco dias e foram observados os sinais de toxicidade (*Screening hipocrático*). Ao final do ciclo a

dose foi aumentada e foi reiniciada a avaliação dos animais. A dose inicial dos compostos foi de 50 mg/Kg de peso corpóreo (FALZARI et al. 2005).

3.2.1.13. Avaliação do potencial ativo dos novos compostos em camundongos BALB/c infectados com MTB Erdmann

3.2.1.13.a. Infecção

A atividade dos novos compostos *in vivo* foi avaliada utilizando MTB Erdmann (item 3.2.1.1.) e camundongos da linhagem BALB/c (item 3.1.7.). A cepa de MTB Erdmann foi descongelada e diluída em PBS 1X até atingir a concentração de 5×10^6 UFC/mL. Os animais foram colocados dentro do sistema de inalação (*Inhalation Exposure System*) (item 3.1.7.) no laboratório de segurança nível 3 (P3) e a tampa foi fechada e totalmente vedada. A suspensão de micobactérias (10 mL) foi injetada no sistema e os animais foram expostos ao aerosol por 30 minutos. Em seguida, ainda no interior da câmara os animais foram submetidos por 30 minutos à radiação de ultra-violeta (U.V.) para sua descontaminação, retirados do sistema e colocados diretamente em gaiolas fechadas contendo filtros na parte superior. Posteriormente os animais foram transferidos para o biotério com nível de segurança 2 (P2) e o sistema de inalação foi exposto a luz U.V. por 30 minutos para descontaminação.

3.2.1.13.b. Controle de Qualidade (CQ)

Pre-T0 – A suspensão bacteriana utilizada na infecção foi diluída em PBS 1X para alcançar concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , e estas foram semeadas em placas de 6 orifícios em meio Middlebrook 7H11 acrescido de 10% de glicerol a 50% e 10% de OADC para confirmar a quantidade de bactérias a que os camundongos foram

expostos (**T0**). As placas foram incubadas a 37°C por 18-20 dias e as colônias foram contadas.

3.2.1.13.c. Controles de infecção

T3 – Três dias após a infecção, 5 camundongos (sem tratamento) foram sacrificados em câmara de CO₂, os pulmões foram retirados cirurgicamente e imediatamente colocados em tubos refrigerados contendo 3 mL de solução salina tamponada Hank's (*Hank's Buffered Salt Solution- HBSS*) estéril para determinar o nível inicial de infecção. Os pulmões foram homogeneizados e sonicados. O homogeneizado obtido (diluído em 3 mL de solução, equivalente a uma diluição de 10⁻¹ levando em consideração o peso do órgão de ~0,3 gramas) foi diluído em PBS 1X e semeado conforme descrito acima.

T10 – No décimo dia todos os animais foram pesados e foi iniciado o tratamento oral diário por gavagem. No mesmo dia, 7 animais (sem tratamento) foram sacrificados e foram empregados os mesmos procedimentos utilizados para o **T3**, usando diluições de 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴. O **T10** foi utilizado como controle de Pré-tratamento.

3.2.1.13.d. Tratamento

Como descrito acima, no 10º dia foi iniciado o tratamento oral diário por gavagem com compostos de rutênio, com a droga padrão **RMP** e com o veículo utilizado para solubilização CMC (Carboximetilcelulose) 0,5%. O tratamento com doses únicas diárias no período diurno estendeu-se até o 31º dia após infecção, consolidando um total de 3 semanas de tratamento com interrupções nos finais de semana. A concentração administrada para o composto **SCAR4** foi de 75 mg/Kg de

peso corpóreo e para o composto **SCAR7** de 50 mg/Kg de peso corpóreo. A **RMP** foi administrada na concentração de 15 mg/Kg de peso corpóreo em doses únicas diárias. O volume administrado diariamente para cada animal não ultrapassou 200 µL.

3.2.1.13.e. Avaliação da atividade dos complexos sobre os camundongos infectados

Ao final do 31º dia, os animais foram pesados, eutanasiados e realizado o procedimento descrito no item 3.2.1.13.c para avaliação da atividade dos compostos na infecção *in vivo*. Os resultados da inibição da infecção pela administração dos compostos, da **RMP** e do CMC a 0,5% no modelo de infecção *in vivo* foram comparados entre si e entre os controles T3, T10 e T31CMC.

3.2.1.14. Avaliação da biodisponibilidade oral, através do screening farmacocinético em camundongos C57BL/6

A determinação da biodisponibilidade *in vivo* dos compostos foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Gruppo et al., (2006). Os animais receberam uma dose oral por gavagem de cada composto (dose menor do que a DL₅₀ pré-determinada, geralmente 300 mg/Kg de peso corpóreo). Nos tempos de 4, 2, 1 h e 20 min, 3 animais tiveram a cauda cortada e o sangue colhido assepticamente (**Figura 8a,b**). O soro foi separado e armazenado a -70°C. Diluições seriadas do soro foram preparadas em concentrações entre 10% a 0,312% e o percentual inibitório dos compostos presentes no soro foi determinado de acordo com a técnica do REMA (item 3.2.1.6.) frente ao MTB H₃₇Rv ATCC 27294. Concentrações do soro acima de 12,5% podem inibir o crescimento do MTB, assim foram consideradas para o estudo apenas as concentrações inferiores. As placas foram preparadas e incubadas de acordo com a metodologia do REMA e a inibição da multiplicação

bacteriana indicou concentrações suficientemente altas dos compostos ou de seus produtos ativos no sangue. Uma estimativa da concentração do composto no soro (em μM) foi obtida usando os dados da CIM (previamente determinada) dos compostos analisados.



(a)



(b)

Figura 8. Coleta da amostra do ensaio de biodisponibilidade oral: (a) Camundongo C57BL/6 imobilizado em contensor para o corte da cauda e colheita do sangue; **(b)** Colheita por gotejamento do sangue próximo ao bico de Bunsen para aumentar a dilatação venosa/arterial e manutenção de ambiente estéril.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados biológicos referente à atividade intra e extra celular contra MTB, e citotoxicidade (IC₅₀) dos complexos que foram selecionados são apresentados no **CAPÍTULO II**, dentro dos trabalhos publicados: Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 598-601, 2010 e Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099-5107, 2011.

4.1. Ensaios *in vitro*

4.1.1. Determinação da CIM frente ao MTB H₃₇Rv em diferentes condições ambientais (normal; pH 6,0; 4% de ASB e 10% de SFB)

A **Tabela 1** mostra os resultados da CIM dos compostos **SCAR** e dos fármacos padrão em diferentes condições utilizando o MABA.

Tabela 1. CIM dos compostos de Ru e dos fármacos padrão frente ao H₃₇Rv em diferentes condições.

Identificação	Compostos	MABA (µM)						
		Normal	pH 6,0		Ligação Proteica			
		CIM	CIM	Razão*	4% ASB		10% SFB	
					CIM	Razão*	CIM	Razão*
SCAR1	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	1,2	2,4	2,0	2,5	2,1	1,3	1,1
SCAR2	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	1,2	2,2	1,8	2,0	1,7	1,3	1,1
SCAR4	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	1,4	2,7	1,9	3,5	2,5	1,9	1,4
SCAR5	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	0,8	1,7	2,1	1,7	2,1	0,8	1,0
SCAR6	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	1,6	4,9	3,1	3,2	2,0	3,1	1,9
SCAR7	Ru(pic)(dppe)(phen)	2,1	2,7	1,3	2,8	1,3	2,5	1,2
Fármacos Padrão								
RMP	Rifampicina	0,1	0,2	2,0	0,2	2,0	0,2	2,0
INH	Isoniazida	0,1	0,2	2,0	0,3	3,0	0,2	2,0
EST	Estreptomina	0,5	0,8	1,6	0,9	1,8	1,3	2,6

*Razão entre a CIM em condições normais e a CIM em diferentes condições.

A CIM dos compostos de Ru foi novamente determinada empregando a metodologia do MABA. Expostos à condição ácida (pH 6,0), os compostos permaneceram ativos com ligeira perda de atividade de forma semelhante aos fármacos padrão utilizados. Os resultados foram expressos pela razão do $CIM_{pH6,0}$ e o CIM em condições normais variando entre 1,3-3,1 para os compostos e para os fármacos padrão entre 1,6-2,0. Esta variação é aceitável do ponto de vista microbiológico uma vez que o valor de CIM de um composto pode variar em até 2 diluições. Exemplificando, o valor de CIM da RMP é expresso no intervalo entre 0,1-0,4 μ M (Handbook of anti-tuberculosis agents, 2008) (em condições normais), o que mostra um fator de diluição de 2x. Estudar a atividade anti-TB em pH ácido é importante, uma vez que este é o pH encontrado no interior do macrófago (ZHANG et al. 2003). A PZA, por exemplo, necessita de ambiente ácido para ser ativa, sendo inativa em condições normais (ZHANG et al. 2003) enquanto que outros fármacos perdem a atividade neste ambiente (Handbook of anti-tuberculosis agents, 2008). Os resultados apresentados na **Tabela 1**, provam que os compostos de Ru são ativos tanto em condições normais quanto em pH ácido, fato que possibilitará uma diminuição da infecção nos granulomas.

Os compostos também foram expostos a outras 2 condições diferentes, uma contendo 4% de ASB e a outra com 10% de SFB. A ASB tem como composição apenas albumina, que é a proteína encontrada em maior concentração no plasma sanguíneo. O SFB além da albumina contém proteínas totais, α , β e γ globulinas, glicose, uréia, creatinina e hemoglobulina. O ensaio *in vitro* contendo os principais componentes do plasma sanguíneo procura mimetizar as condições encontradas *in vivo*. No caso, a utilização dessas altas concentrações funciona como um *screening* negativo, ou seja, caso o composto apresente uma perda significativa na atividade,

pode-se sugerir que esse composto interagiu irreversivelmente com algum componente do plasma estudado e que esta ligação irreversível provavelmente ocorrerá *in vivo*. Por outro lado, caso o composto não apresente perda de atividade, podemos apenas sugerir que isso não ocorrerá *in vivo*, porém a dinâmica que ocorre no homem é muito mais complexa.

As concentrações de 4% e 10% de ASB e SFB, respectivamente, são as maiores permitidas acima das quais ocorre inibição da multiplicação micobacteriana. Os resultados da **Tabela 1** mostram uma variação da razão $CIM/CIM_{ASB4\%}$ de 1,3-2,7 para os compostos de rutênio e para os fármacos padrão de 1,8-3,0. A outra razão apresentada $CIM/CIM_{SFB10\%}$ mostra uma variação de 1,0-1,9 para os compostos de Ru e de 2,0-2,6 para os fármacos padrão. Como descrito acima, esta redução da atividade em relação ao CIM em ambientes normais é totalmente aceitável. Esses resultados sugerem que os compostos de Ru não possuem afinidade significativa com componentes do plasma testados ou possuem uma interação reversível.

4.1.2. Painel com perfil de sensibilidade/resistência construído com 58 isolados clínicos sensíveis, mono e multidrogas resistentes (TB-MDR).

Os resultados genotípicos e fenotípicos do painel referente aos fármacos INH e RMP foram publicados: Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic methods. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 456-459, 2011 (MIYATA et al. 2011).

A **Tabela 2** apresenta os resultados fenotípicos de sensibilidade/resistência de cada uma das metodologias e o *cut-off* para o método do REMA.

Tabela 2. Teste de sensibilidade de 58 isolados clínicos sensíveis, mono e MDR-TB pelo método do BACTEC™ MGIT™ 960 e REMA

Fármaco	BACTEC™ MGIT™ 960		REMA		Cut-off REMA
	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	
Isoniazida (INH)	18	40	18	40	> 0,5
Rifampicina (RMP)	22	36	25	33	> 0,125
Estreptomicina (EST)	32	26	27	31	> 0,25
Etambutol (EMB)	39	19	24	34	> 8

A comparação do desempenho entre as metodologias foi avaliada utilizando os critérios de sensibilidade e especificidade, juntamente com o cálculo da área sob a curva (ASC) fornecidos pelo software MedCalc dos fármacos INH, RMP, EST e EMB e apresentado nos **Gráficos 1, 2, 3 e 4** respectivamente.

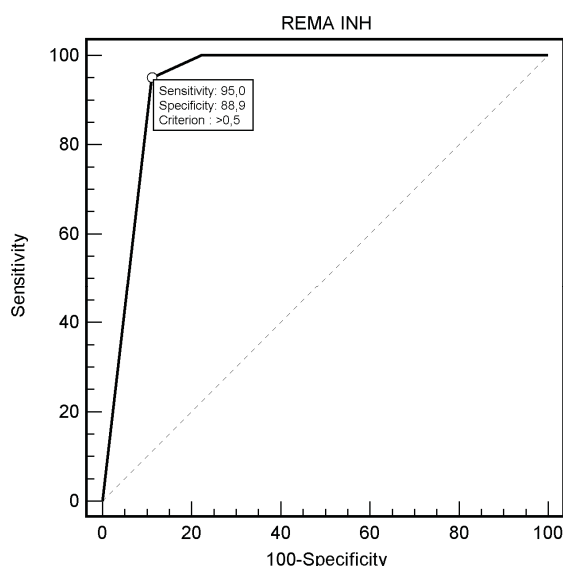


Gráfico 1. Curva ROC (receiver operating characteristic) determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e *cut-off* da INH.

O **Gráfico 1** apresenta os parâmetros da INH, onde pode ser observado valor de sensibilidade de 97,5% e 88,9% de especificidade, ASC de 0,939, juntamente com o *cut-off* > 0,5. A sensibilidade de um método mede a capacidade do teste em identificar corretamente o valor verdadeiramente positivo (no caso, cepas resistentes) entre aqueles que a possuem, ou seja, o quão sensível é o teste. A especificidade mede a capacidade do teste em excluir corretamente resultados

verdadeiramente negativos (no caso, cepas sensíveis), ou seja, o quão específico o teste é. No caso da INH, 4 amostras dentre as 58 analisadas foram discordantes entre os métodos. Considerando a metodologia do BACTEC™ MGIT™ 960, como variável padrão, encontramos 2 amostras verdadeiramente positivas (resistentes) para essa metodologia, apresentando resultados falso negativos para o REMA (sensíveis). As outras 2 amostras discordantes apresentaram resultados negativos (sensíveis) para o BACTEC™ MGIT™ 960 e falsamente positivos para o REMA (resistentes).

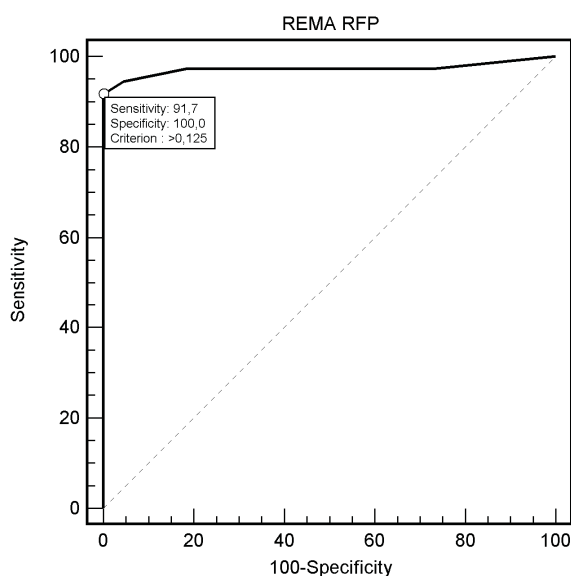


Gráfico 2. Curva ROC determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e cut-off da RMP.

No **Gráfico 2** são apresentados os parâmetros da RMP. Valores de sensibilidade de 91,7% e 100% de especificidade, ASC de 0,972, juntamente com o *cut-off* > 0,125, são observados. Para a RMP foram encontradas 3 amostras discordantes. As 3 amostras apresentaram resultados verdadeiramente positivos para o BACTEC™ MGIT™ 960 (resistentes) e falsos negativos para o REMA. Essa discordância foi a responsável pela diminuição do índice de sensibilidade entre as técnicas. Por outro lado, todos os verdadeiros negativos (sensíveis) apresentaram 100% de coerência entre as técnicas, com 100% de especificidade.

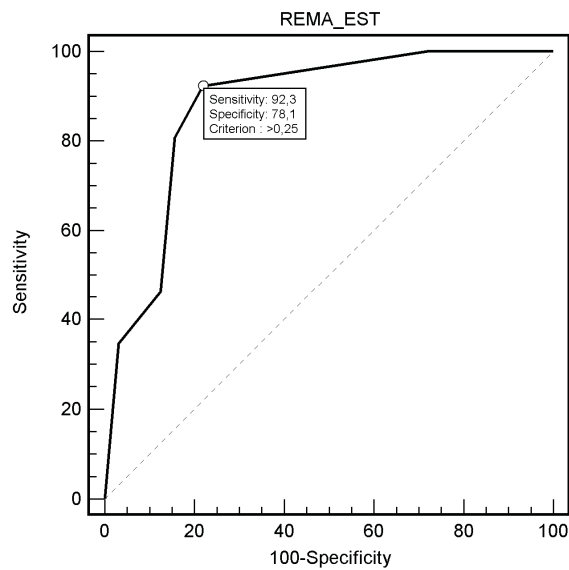


Gráfico 3. Curva ROC determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e cut-off da EST.

Os parâmetros apresentados no **Gráfico 3** são referentes a EST, onde pode ser observado valor de sensibilidade de 92,3% e 78,1% de especificidade, ASC de 0,879, juntamente com o *cut-off* > 0,25. Na EST foi verificado alto índice de sensibilidade nas duas técnicas devido ao baixo número de falsos negativos (sensíveis) (2 amostras entre 9 discordantes), por outro lado o valor de especificidade foi menor em relação a sensibilidade e também quando comparado entre a INH e RFP, isto devido a 7 amostras com resultados falsamente positivos (resistentes) para o REMA.

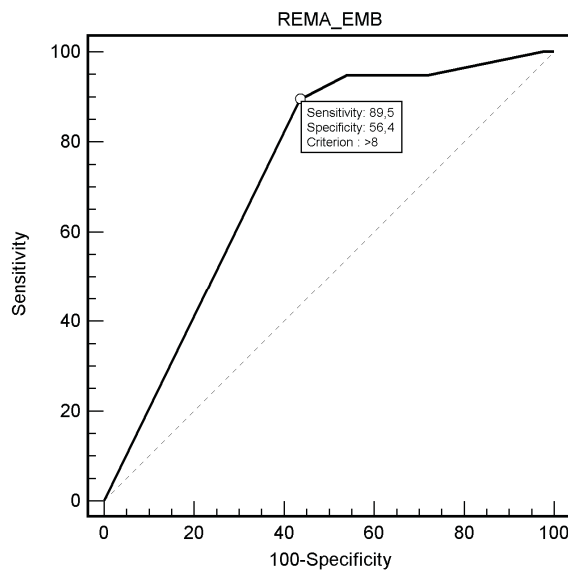


Gráfico 4. Curva ROC determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e cut-off da EMB.

Por fim o **gráfico 4** apresenta os parâmetros do EMB, onde pode ser observado valor de sensibilidade de 89,5% e 56,4% de especificidade, ASC de 0,734, juntamente com o *cut-off* > 8. No EMB foi verificado maior discrepância de resultados entre as metodologias. Aqui, entre as 58 amostras analisadas, 18 mostraram ser discordantes. O índice de sensibilidade manteve-se dentro dos valores quando comparado aos outros fármacos, (2 amostras discordantes), e com resultado próximo a 90%. Por outro lado, a especificidade foi muito baixa quando comparada aos outros fármacos, 16 amostras apresentaram discordância com resultados falsamente positivos (resistentes) para a metodologia do REMA.

Neste estudo, a curva ROC, possibilitou determinar a acurácia da técnica do REMA quando comparada ao BACTEC™ MGIT™ 960. Entende-se por acurácia de um teste a avaliação da capacidade discriminatória de resultados positivos e negativos do novo teste (no caso o REMA), quando comparado ao ensaio padrão já validado (LUNA-HERRERA et al. 2003). A metodologia do REMA devido à facilidade de execução e reprodutibilidade tem sido largamente utilizada por outros autores (PALOMINO et al. 2002; MARTIN et al. 2005) e por nós (SANTOS et al.

2009; PAVAN et al. 2010; PAVAN et al. 2010; TARALLO et al. 2010; MIYATA et al. 2011). O diferencial neste caso é a população de amostras utilizadas vindas de um centro diagnóstico da cidade de São Paulo, nunca antes estudada. É visto também que a metodologia do REMA e do MABA, por serem metodologias quantitativas possuem discrepâncias muito grandes entre os autores em relação aos *cut-offs* e conseqüentemente na determinação dos CIMs e do perfil de resistência/sensibilidade (FRANZBLAU et al. 1998; PALOMINO et al. 2002; MARTIN et al. 2005).

A análise da acurácia do teste é realizada observando as características da curva ROC: quanto mais próximo a curva segue próxima ao eixo Y até o topo, mais exato é o teste, quanto mais afastado do eixo Y menos exato é o teste. Uma área de 1 representa que o teste é perfeitamente reprodutivo, por outro lado uma área de 0,5 representa que o teste não é reprodutivo. Os seguintes parâmetros são dados para avaliar a acurácia do teste, baseados na ASC: 1-0,9 = excelente; 0,9-0,8 = bom; 0,8-0,7 = razoável; 0,7-0,6 = fraco e 0,6-0,5 = falho (LUNA-HERRERA et al. 2003).

Pela observação dos dados de ASC discriminados acima pode-se verificar que a técnica do REMA além de fornecer dados quantitativos (CIM), ainda apresentou concordância excelente com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 para os fármacos INH e RMP (MIYATA et al. 2011), bom para EST e razoável para EMB. Estudo multicêntrico também confirmou a discrepância de resultados para as duas técnicas, com relação ao EMB (MADISON et al. 2002).

4.1.3. Determinação da atividade anti-MTB dos compostos frente aos 25 isolados clínicos selecionados com perfil de sensibilidade/resistência

Os valores da CIM dos compostos **SCAR** frente ao painel de isolados clínicos sensíveis, mono e MDR-TB previamente determinados e apresentados no item 4.1.2. (MIYATA et al. 2011) foram avaliados empregando a metodologia de Luna-herrera et al, (2003), descritas no item 3.2.1.6. e são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Valores de CIM dos complexos de Ru frente aos isolados clínicos sensíveis, mono e MDR-TB.

Nº isolado Clínico	Fármacos Padrão BACTEC™ MGIT™ 960				Compostos SCAR (REMA) - µM					
	RMP	INH	SM	EMB	1	2	4	5	6	7
H37Rv	S	S	S	S	1,2	1,2	1,4	0,8	1,6	2,1
Isolados Sensíveis										
16	S	S	S	S	6,5	3,2	3,7	2,7	4,1	3,6
40	S	S	S	S	1,6	1,6	1,8	1,3	16,6	nd
48	S	S	S	S	13,1	3,2	3,7	1,3	>33,1	nd
66	S	S	S	S	>26,1	3,2	7,3	2,7	>33,1	nd
68	S	S	S	S	3,3	1,6	1,8	1,3	2,1	nd
71	S	S	S	S	3,3	1,6	1,8	1,3	>33,1	nd
72	S	S	S	S	3,3	3,2	3,7	1,3	>33,1	nd
75	S	S	S	S	26,1	1,6	1,8	1,3	>33,1	nd
Isolados Mono-Resistentes										
15	S	R	S	S	6,5	1,6	3,7	1,3	4,1	3,6
77	S	R	S	S	6,5	6,4	7,3	5,3	nd	7,2
98	R	S	S	S	1,6	1,6	1,8	0,3	16,6	1,8
181	S	S	R	S	1,6	1,6	1,8	0,3	nd	1,8
Isolados Multi-Drogas-Resistentes (TB-MDR)										
84	R	R	S	S	3,3	3,2	1,8	1,3	nd	1,8
145	R	R	S	S	1,6	1,6	1,8	0,7	nd	1,8
173	R	R	S	S	3,3	3,2	3,7	2,7	>33,1	3,6
176	R	R	S	S	26,1	1,6	3,7	2,7	>33,1	nd
46	R	R	R	S	6,5	1,6	3,7	2,7	16,6	7,15
142	R	R	R	S	26,1	1,6	1,8	2,7	4,1	nd
92	R	R	R	S	>26,1	6,4	7,3	5,3	>33,1	nd
93	R	R	R	S	26,1	3,2	3,7	2,7	>33,1	nd
59	R	R	S	R	13,1	1,6	1,8	0,3	>33,1	nd
61	R	R	R	R	6,5	1,6	3,7	1,3	>33,1	7,15
97	R	R	R	R	13,1	3,2	1,8	1,3	33,1	nd
104	R	R	R	R	3,3	0,8	1,8	0,3	8,3	0,9
185	R	R	R	R	25	0,39	0,39	0,39	>25	nd

nd – não determinado

Dentre os 58 isolados de MTB que compõem o painel (MIYATA et al. 2011), 25 foram selecionados e utilizados para análise, procurando envolver a maior diversidade possível dos perfis de resistência. Assim, 8 isolados eram sensíveis à todos os fármacos, 4 mono resistentes e 13 MDR-TB, segundo a técnica do BACTEC™ MGIT™ 960. A avaliação de compostos frente a isolados clínicos resistentes pode fornecer dados sobre a possível resistência cruzada dos novos compostos com os fármacos. Dentro de nosso *pipeline* compostos com atividade inferior ou igual a 10 µM, são considerados potenciais agentes anti-TB (PAVAN et al. 2011). Os resultados da atividade dos compostos de Ru frente as bactérias do painel são apresentados abaixo:

SCAR1 - Apresentou atividade promissora sobre 15 isolados (CIM ≤10 µM) (5 sensíveis, 4 mono e 6 MDR-TB), com CIMs variando entre 1,6 a 6,5 µM. Quando resistentes (CIM >10 µM) o CIM variou entre 13,1 a >26,1 µM.

SCAR2 - Apresentou atividade promissora contra todos os isolados clínicos analisados. O intervalo de valores de CIMs entre os diferentes isolados variou entre 0,39 a 6,4 µM.

SCAR4 - Apresentou atividade promissora contra todos os isolados clínicos analisados. O intervalo de valores de CIMs entre os diferentes isolados variou entre 0,39 a 7,3 µM.

SCAR5 - Apresentou atividade promissora contra todos os isolados clínicos analisados. O intervalo de valores de CIMs entre os diferentes isolados variou entre 0,3 a 5,3 µM.

SCAR6 - Apresentou atividade promissora em apenas 4 isolados (2 sensíveis, 1 mono e 1 MDR-TB) entre os 20 analisados com CIMs variando entre 2,1 a 8,3 µM. Quando resistentes o CIM variou entre 16,6 a >33,1 µM.

SCAR7 - Apresentou atividade promissora contra todos os isolados clínicos analisados. O intervalo de valores de CIMs entre os diferentes isolados variou entre 0,9 a 7,2 μM .

Considerações gerais – Os compostos **SCAR2, 4, 5 e 7** demonstraram alta atividade contra os 25 isolados clínicos testados. Quando os valores de CIMs dos compostos de Ru são comparados aos da literatura, nota-se que estes são comparáveis ou até mais promissores do que os apresentados por alguns novos candidatos. Exemplificando, o nitroimidazol PA-824 (STOVER et al. 2000; LENAERTS et al. 2005) frente a cepas mono e MDR-TB, apresentou valores de CIM entre 0,1 a 0,7 μM e valores de CIM entre 0,5 a 1,8 μM foi observado para o análogo de diamina de EMB SQ109 (NIKONENKO et al. 2007) frente a amostras resistentes ao EMB, INH e RMP.

Analisando os resultados, verificamos também que os compostos **SCAR2, 4, 5 e 7** não apresentaram resistência cruzada com os fármacos INH, RMP, EST e EMB, concluindo indiretamente que o mecanismo de ação e/ou alvos desses compostos são diferentes aos desses fármacos. Quanto aos compostos **SCAR1 e 6** nota-se um perfil diferente, onde os resultados apontam que esses compostos não possuem resistência cruzada com INH, RMP, EST e EMB, mas não deixa claro se os isolados possuem resistência natural a eles ou se possuem resistência cruzada com algum outro fármaco não analisado no experimento.

4.1.4. Avaliação da atividade *in vitro* de combinações dos compostos candidatos entre os fármacos da atual terapêutica utilizando metodologia de *checkerboard*

A **Tabela 4** apresenta os resultados da interação entre os compostos **SCAR** e os fármacos RMP, INH, EST, EMB e MOX através do modelo de *checkerboard*.

Tabela 4. Resultados de interação entre os compostos de Ru com RMP, INH, EST, EMB e MOX contra MTB H₃₇Rv

Compostos/Fármacos padrão	CIF	Interação	Compostos/Fármacos padrão	CIF	Interação
Rifampicina (RMP)			Etambutol (EMB)		
SCAR1	1,0	Sinergismo	SCAR1	1,6	Neutro
SCAR2	2,0	Neutro	SCAR2	1,6	Neutro
SCAR4	1,0	Sinergismo	SCAR4	3,3	Neutro
SCAR5	1,1	Neutro	SCAR5	1,7	Neutro
SCAR6	1,0	Sinergismo	SCAR6	1,6	Neutro
SCAR7	1,0	Sinergismo	SCAR7	2,4	Neutro
Isoniazida (INH)			Moxifloxacino (MOX)		
SCAR1	1,4	Neutro	SCAR1	2,5	Neutro
SCAR2	1,0	Sinergismo	SCAR2	1,3	Neutro
SCAR4	1,0	Sinergismo	SCAR4	1,3	Neutro
SCAR5	1,0	Sinergismo	SCAR5	2,6	Neutro
SCAR6	0,5	Sinergismo	SCAR6	0,8	Sinergismo
SCAR7	1,0	Sinergismo	SCAR7	2,5	Neutro
Estreptomicina (EST)					
SCAR1	1,3	Neutro			
SCAR2	1,3	Neutro			
SCAR4	1,3	Neutro			
SCAR5	1,4	Neutro			
SCAR6	0,5	Sinergismo			
SCAR7	1,3	Neutro			

Qualquer novo fármaco anti-TB deve ser utilizada em combinação com outros fármacos a fim de se evitar o aparecimento de cepas resistentes a nova droga (CHEN et al. 2006). Todos os compostos de Ru (**Tabela 4**) mostraram apenas resultados positivos na avaliação da interação farmacológica com todos os cinco fármacos analisados. Os resultados variaram de sinergismo, quando a atividade do composto foi potencializada ou potencializou o outro fármaco que foi testado junto, e resultados de neutralidade, quando a atividade de ambos continuou a mesma sem haver interferência, ou seja, sem antagonismo. A melhor interação de sinergismo foi

observada com o fármaco INH com exceção apenas do composto **SCAR1** (neutralidade). A interação menos favorável foi com EMB onde nenhuma interação foi observada com os compostos analisados (neutro).

4.1.5. Avaliação da atividade dos novos compostos frente ao MTB persistente sem replicação, empregando MTB recombinante H₃₇Rv (pFCA-luxAB) e ensaio de recuperação com baixa oxigenação (LORA-Low Oxygen Recovery Assay)

Na **Tabela 5** são apresentados os resultados da CIM dos compostos **SCAR** e dos fármacos padrão frente ao MTB H₃₇Rv (pFCA-luxAB) em estado de latência.

Tabela 5. CIM dos compostos de Ru e dos fármacos padrão frente ao MTB H₃₇Rv (pFCA-luxAB) em estágio de persistente sem replicação fase II (PSR II).

Identificação	Compostos	LORA CIM (µM)
SCAR1	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,55
SCAR2	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	0,46
SCAR4	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	0,53
SCAR5	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	0,31
SCAR6	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	0,42
SCAR7	Ru(pic)(dppe)(phen)	1,21
Fármacos Padrão		
RMP	Rifampicina	0,84
INH	Isoniazida	> 507
EST	Estreptomicina	3,52
EMB	Eambutol	> 24,2
MOX	Moxifloxacino	6
PA-824	PA-824	0,65

O controle e erradicação completa da tuberculose são frustrados pela habilidade do MTB de permanecer em estado de latência no hospedeiro por meses ou anos, até mesmo sob condições de quimioterapia (WAYNE 1994). MTB que requer abundância de O₂ para multiplicação ativa se torna microrganismo persistente sem replicação (PSR) quando submetido a uma depleção gradual e controlada das condições de O₂. A mudança de crescimento ativo aeróbio (CAA) para PSR, durante

a depleção controlada de O₂ ocorre em 2 fases discretas, que inicia com microaerofilia fase I (PSR I) e finaliza com a fase anaeróbia II (PSR II) (WAYNE e HAYES, 1996). O entendimento do estado fisiológico no MTB em estado de latência é importante porque possibilita sugerir estratégias para desenvolvimento de novos quimioterápicos em erradicar tais infecções (MA et al. 2010). Soma-se a isso a carência de fármacos ativos contra bactérias latentes na terapêutica atual (RUSSELL 2001). Alguns compostos novos atualmente na fase clínica, como por exemplo, TMC-207 e PA-824 apresentaram atividade *in vitro*, sobre infecção latente (MA et al. 2010).

Desta forma, os compostos de Ru, como observado na **Tabela 5**, podem ser uma esperança no tratamento da infecção latente, pois, apresentam atividade *in vitro* em bactérias PSR II pelo modelo do LORA. Estes valores são superiores a atividade dos mesmos em condições aeróbias (**Tabela 1**), melhores do que os dos fármacos utilizados na atual terapêutica (RMP, INH, EST e EMB) e do que a da MOX sendo mais efetivos do que os dos fármacos que estão em fase clínica de desenvolvimento como o PA-824.

4.1.6. Determinação do espectro de atividade

Na **Tabela 6** são apresentados os resultados da CIM dos compostos **SCAR** e dos fármacos padrão frente a uma série de diferentes microrganismos.

Tabela 6. Espectro de Atividade dos compostos de Ru e das drogas padrões

Identificação	Compostos	Espectro de atividade (μM)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. smegmatis</i>
SCAR1	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	> 10,4	5,1	> 10,4	5,2
SCAR2	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	> 10,2	2,4	> 10,2	5,0
SCAR4	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	> 11,8	4,6	> 11,8	5,7
SCAR5	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	> 8,5	0,3	1,9	5,3
SCAR6	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	> 13,3	5,9	> 13,3	> 13,3
SCAR7	Ru(pic)(dppe)(phen)	> 11,4	5,5	> 11,4	5,6
Fármacos Padrão					
GTM	Gentamicina	1,0	0,6	-----	-----
RMP	Rifampicina	-----	-----	-----	>100
INH	Isoniazida	-----	-----	-----	>100
SM	Estreptomicina	-----	-----	-----	0,9
MOX	Moxifloxacino	-----	-----	-----	0,2
MET	Metronidazol	-----	-----	-----	>512
TMC	TMC-207	-----	-----	-----	0,06

O espectro de atividade ou espectro de ação refere-se à diversidade de organismos passíveis de serem afetados por um agente antimicrobiano (Handbook of anti-tuberculosis agents, 2008). Com exceção do **SCAR6**, os complexos de Ru que foram ativos contra MTB, apresentaram também atividade contra *M. smegmatis* com variação insignificante entre eles. Essa atividade foi inferior a apresentada pela EST, MOX e TMC-207 (0,9; 0,2 e 0,06 μM respectivamente), mas superior (mais de 100x) aos fármacos como RMP, INH e MET. Em relação ao *S. aureus*, todos os compostos apresentaram atividade inibitória semelhante à atividade frente ao *M. smegmatis*. Os compostos **SCAR2** e **SCAR5** (2,4 e 0,3 μM respectivamente) foram os mais ativos contra o *S. aureus* e a atividade o composto **SCAR5** foi semelhante a da GTM (0,6 μM). Apenas o **SCAR5** foi ativo contra *C. albicans* (1,9 μM) e em *E. coli* nenhum dos compostos apresentou atividade inibitória significativa. Mesmo o complexo **SCAR5** que apresentou espectro mais amplo do que os outros (ativo contra *M. smegmatis*, *C. albicans*, *S. aureus*), não foi efetivo sobre *E. coli*. Os complexos com exceção do **SCAR6** que é restrito a apenas MTB e *S. aureus*, parecem ser ativos em bactérias gram positivas e em outras espécies micobacterianas além do MTB.

O complexo **SCAR5** apresentou espectro um pouco mais amplo do que os outros, sendo ativo contra *M. smegmatis*, *C. albicans*, *S. aureus*, mas não foi efetivo sobre *E. coli*. Os complexos com exceção do **SCAR6** que é restrito a apenas MTB e *S. aureus*, parecem ser ativos em bactérias gram positivas e em outras espécies micobacterianas além do MTB.

4.2. Ensaios *in vivo*

4.2.1. Avaliação da Toxicidade Aguda dos compostos em camundongos C57BL/6.

A **Tabela 7** apresenta a concentração única dos compostos **SCAR** e da RMP administrados e a porcentagem de perda dos animais.

Tabela 7. Concentração única administrada via oral e a porcentagem de perdas dos animais.

Compostos	Doses (mg/kg/peso corpóreo)	Perdas (%)
SCAR1	2.000	0
	1.000	n.d.
SCAR2	2.000	83,33
	1.000	16,6
SCAR4	2.000	16,6
	1.000	n.d.
SCAR5	2.000	50
	1.000	n.d.
SCAR6	2.000	0
	1.000	n.d.
SCAR7	2.000	100
	1.000	83,3
	500	0
RMP	2.000	0
	1.000	0

n.d. – não determinado

A análise da toxicidade aguda foi determinada como descrito por Larini et al., (1987) e classificada no método de categorias como descrito pelo manual OECD,

(2001). A discussão sobre os dados relevantes deste estudo é apresentada abaixo caso a caso:

SCAR1 – Demonstrou ser pouco tóxico ($DL_{50} > 2000$ mg/Kg) com nenhuma perda acidental. O estudo hipocrático não mostrou alterações comportamentais em nenhum dos animais durante o período do estudo. A análise macroscópica dos órgãos não apresentou alterações morfológicas e a análise estatística do peso final e dos órgãos não apresentou diferença significativa. De acordo com classificação de Larini et al., (1987), os agentes tóxicos via oral são considerados como: extremamente tóxicos (DL_{50} for igual ou inferior a 25 mg/kg, altamente tóxicos (DL_{50} entre 100 e 500 mg/kg), mediamente tóxicos (DL_{50} entre 500 e 2000 mg/kg) e pouco tóxicos (DL_{50} acima de 2000 mg/kg). Pelo método de categorias, **SCAR1** se enquadra na Classe 5 (substância com DL_{50} superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg), sendo considerada de baixa toxicidade onde somente em casos excepcionais é que existe justificativa do uso da dose de 5000 mg/kg (OECD, 2001).

SCAR2 – Demonstrou ser mediamente tóxico. Quando administrado na dose de 2000 mg/Kg de peso corpóreo, levou a perda acidental de 5 entre os 6 animais do grupo. Ao diminuir a dose para 1000 mg/Kg de peso corpóreo, o composto levou a perda acidental de apenas 1 animal no período de 24 horas. O estudo hipocrático não mostrou alterações comportamentais em nenhum dos animais durante o período do estudo. A análise macroscópica dos órgãos não apresentou alterações morfológicas. A análise estatística do peso final dos animais e do peso dos órgãos apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao peso final, índice hepatossomático e relação pâncreas/peso corpóreo em relação ao grupo controle.

SCAR2 foi classificado como mediamente tóxico e de Classe 4.

SCAR4 - Na concentração de 2000 mg/Kg de peso corpóreo, levou a perda accidental de apenas 1 animal no período de 48 horas. O estudo hipocrático apresentou de rara a pouca atividade geral em 2 animais. A análise macroscópica dos órgãos não apresentou alterações morfológicas e a análise estatística do peso final e dos órgãos não apresentou diferença significativa. O composto foi classificado como substância de baixa toxicidade e de classe 5.

SCAR5 - Na concentração de 2000 mg/Kg de peso corpóreo, levou a perda accidental de 3 animais durante o decorrer do experimento, atingindo o valor de DL_{50} nessa concentração. O estudo hipocrático não mostrou alterações comportamentais em nenhum dos animais durante o período do estudo. A análise macroscópica dos órgãos não apresentou alterações morfológicas e a análise estatística do peso final e dos órgãos não apresentou diferença significativa. O composto foi classificado como substância de média toxicidade e de classe 4.

SCAR6 – Na concentração de 2000 mg/Kg de peso corpóreo não causou perda de nenhum dos animais do grupo. O estudo hipocrático também não mostrou alterações comportamentais em nenhum dos animais durante o período do estudo. A análise macroscópica dos órgãos e os pesos dos animais e dos órgãos não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os animais tratados e o grupo controle. O composto foi classificado como substância de baixa toxicidade e de classe 5.

SCAR7 – Demonstrou ser mediamente tóxico. Quando administrado na dose de 2000 mg/Kg de peso corpóreo, levou a perda accidental dos 6 animais do grupo. Ao diminuir a dose para 1000 mg/Kg de peso corpóreo, o composto levou a perda accidental 5 entre os 6 animais do grupo no período de 24 horas. Na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo não se observou perdas até o término do experimento. No estudo hipocrático não foi verificado alterações comportamentais em nenhum dos

animais durante o período do estudo. A análise macroscópica dos órgãos não apresentou alterações morfológicas. A análise macroscópica dos órgãos e os pesos dos animais e dos órgãos não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os animais tratados e o grupo controle. **SCAR7** foi classificado como mediamente tóxico e de Classe 4.

RMP - Nas doses de 2000 mg/Kg e 1000 mg/Kg de peso corpóreo não causaram perda de nenhum dos animais dos grupos. O estudo hipocrático também não mostrou alterações comportamentais em nenhum dos animais durante o período do estudo. A análise macroscópica dos órgãos e os pesos dos animais e dos órgãos não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os animais tratados e o grupo controle. O composto foi classificado como substância de baixa toxicidade e de classe 5.

Considerações Gerais – Os compostos de rutênio e a RMP podem ser classificados da seguinte maneira:

SCAR1, SCAR4, SCAR6 e RMP - Substâncias de baixa toxicidade segundo Larini et al., (1987) e de classe 5 de acordo com o manual do OECD, (2001).

SCAR2, SCAR5 e SCAR7 – Substâncias de média toxicidade e classe 4.

4.2.2. Tolerabilidade *in vivo*

O ensaio de tolerabilidade foi realizado para os compostos **SCAR4** e **SCAR7** com concentração inicial de 75 mg/Kg de peso corpóreo para ambos. Os animais que receberam o composto **SCAR4** nessa concentração apresentaram comportamento normal durante as 3 semanas e nenhuma perda de peso significativa. Os animais que receberam o composto **SCAR7** nesta concentração apresentaram ao final da 1ª semana uma leve diminuição na atividade

comportamental o que foi recuperada a partir da 2ª semana com a redução da concentração para 50 mg/Kg de peso corpóreo o que perdurou por todo o experimento resultando na normalidade comportamental e a perda de peso não significativa ao final do experimento. Em conclusão, definiu-se as doses de 75 e 50 mg/Kg de peso corpóreo para os compostos **SCAR4** e **SCAR7** como concentrações ótimas para ser utilizada nos camundongos no modelo de infecção *in vivo*.

4.2.3. Avaliação da potencialidade dos novos compostos em modelo de infecção aguda

Os compostos **SCAR4** e **SCAR7** foram avaliados quanto a sua atividade em camundongos BALB/c e os resultados são apresentados no **Gráfico 5**.

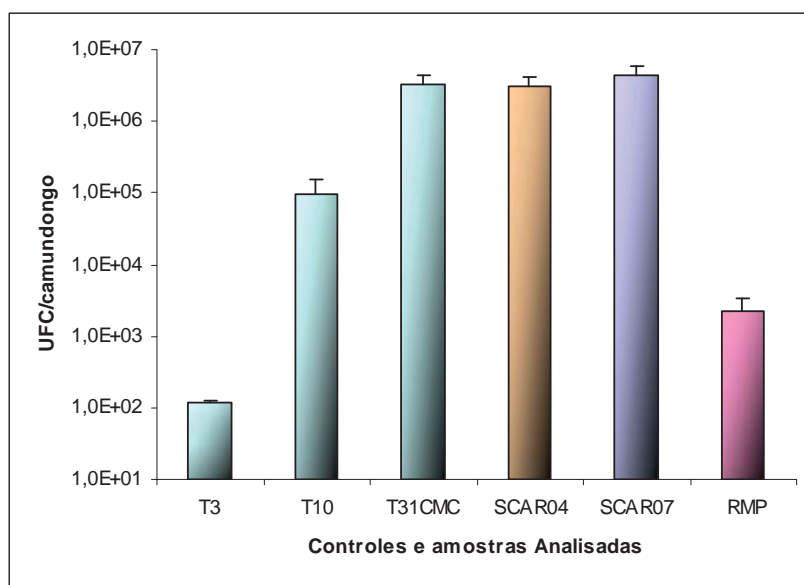


Gráfico 5. Três semanas de tratamento com os compostos **SCAR** e a RMP contra MTB Erdmann em camundongos BALB/c no modelo de infecção aguda.

O **Gráfico 5** comprova a eficácia do modelo experimental, podendo-se observar um aumento exponencial da infecção após o T0 nas 3 primeiras colunas do gráfico (T3, T10 e T31CMC_{0,5%}). O modelo utilizado mostrou ser reprodutivo, com

tempo de duração intermediário, sem diferenças estatísticas significantes entre os camundongos dos grupos e de baixo custo, visto que os animais utilizados não são animais GKO (nocautes) como utilizados em outros experimentos.

A população bacteriana encontrada nos controles T3, T10 e T31CMC_{0,5%} foram de $1,2 \times 10^2$, $9,4 \times 10^4$ e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL respectivamente. A RMP utilizada como fármaco controle foi administrada na concentração de 15 mg/Kg de peso corpóreo. O fármaco controle reduziu a carga bacilar pulmonar em relação ao T31CMC_{0,5%} em 3×10^6 UFC/mL, estabelecendo uma população final nos pulmões de $2,3 \times 10^3$ UFC/mL.

Com relação aos compostos **SCAR4** e **SCAR7**, a carga bacilar encontrada nos pulmões dos animais tratados com os compostos foi de $3,2 \times 10^6$ e $4,3 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Esses resultados mostram que a população bacteriana encontrada nos pulmões dos animais tratados com os compostos e o grupo controle T31CMC_{0,5%} não diferiram significativamente. Portanto, os dois compostos foram ineficazes na infecção *in vivo*, não reduzindo a carga bacilar pulmonar.

Alguns fatores foram avaliados para explicar a falta de atividade dos compostos no modelo *in vivo*. Um dos motivos levantados foi o não conhecimento das propriedades farmacocinéticas dos compostos. Para tal, o modelo de biodisponibilidade oral foi acrescentado ao *pipeline* e os compostos analisados quanto a esse quesito.

4.2.4. Avaliação da biodisponibilidade oral, como *screening* farmacocinético em camundongos C57BL/6

A biodisponibilidade dos compostos e da RMP foi avaliada de acordo com a metodologia sugerida por (GRUPPO et al. 2006). A presença dos compostos no soro

caudal foi realizada através da metodologia do REMA (PALOMINO et al. 2002). Uma estimativa da concentração do composto ou de seus produtos ativos no soro (em μM) foi obtida usando os dados da CIM (previamente determinada) dos compostos analisados.

Nesta metodologia, não é avaliada a via de absorção do composto (estomacal, intestinal...), ou mesmo as questões mais aprofundadas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Este ensaio é um *screening* rápido que revela se o composto ou seu produto ativo foi absorvido ou não quando presente na corrente sanguínea. O ensaio ainda propicia uma estimativa da quantidade ativa do composto (em μM ou $\mu\text{g/mL}$) no soro em relação ao administrado ao animal.

Para calcular o valor estimado do composto (ou produtos) ativo (s), levou-se em consideração primeiramente o orifício o qual se atingiu 90% de inibição bacteriana (CIM). Nesse orifício a concentração do composto que está presente no soro é igual ou superior aquela determinada em ensaios anteriores onde procurou conhecer a CIM do composto. Entretanto, no ensaio o soro não foi adicionado na concentração total (100%), devido a sua toxicidade. Assim, foi iniciada a diluição seriada com 10% do soro. Para estimar a concentração do composto no soro, multiplicou-se o CIM (já conhecido em ensaios anteriores) pelo fator de diluição do soro onde encontrou-se a CIM (100/pela concentração do soro). Exemplo: Um composto A foi administrado via oral na concentração de 200 mg/Kg de peso corpóreo. Sabe-se que o CIM dele é de 1 μM . No ensaio utilizando o soro, observou-se o CIM na diluição do soro de 1/10 (10% de soro no ensaio). O fator de diluição no caso foi de 10x (100/10 (100/pela concentração do soro)). Multiplicando o fator de diluição pelo CIM já conhecido chega-se ao valor de 10. Assim, estima-se que a

partir de uma administração oral de 200 mg/Kg de peso corpóreo, a concentração do composto ou de seu produto ativo no soro é de 10 µM.

A **Tabela 8** apresenta os dados da biodisponibilidade oral encontrados para RMP e os compostos **SCAR**.

Tabela 8. Dados do ensaio de *screening* farmacocinético utilizando amostras de soro e o ensaio do REMA.

Composto	CIM (µM)	Concentração do composto (mg/Kg de peso corpóreo)	Dados no modelo Animal			
			Níveis de concentração (µM) aproximado do composto no soro depois:			
			20 min	1 h	2 h	4 h
RMP	0,015	15	0,5	1,1	1,1	1,6
SCAR1	0,95	300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SCAR2	0,50	300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SCAR4	0,74	300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SCAR5	0,22	300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SCAR6	5,17	300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SCAR7	0,68	300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – Não detectado. Valores inibitórios inferiores ao limite do ensaio. A detecção limite do ensaio é de 10x o CIM do composto teste no soro (devido a restrição em usar a concentração máxima de 10% de soro no ensaio do REMA).

Pela submissão dos compostos **SCAR** ao ensaio de biodisponibilidade oral foi possível explicar o fato dos mesmos não apresentarem atividade no tratamento dos animais infectados. Os resultados do ensaio indicaram que nenhum dos compostos **SCAR** estava presente no soro analisado em quantidade suficiente para ser detectado para fornecer dados de concentração inibitória.

O ensaio de biodisponibilidade oral é uma ferramenta extremamente útil para o *screening* de novos fármacos dentro do *pipeline* em desenvolvimento pelo grupo. Os resultados desse ensaio fornecerão subsídios para prosseguir o estudo dentro do *pipeline*, que consiste no tratamento de animais infectados que também representa a etapa final do *pipeline* proposto pelo grupo. Neste último ensaio, caso os compostos

apresentem resultados promissores reduzindo a carga bacilar pulmonar, pode ser dada continuidade à pesquisa, com proposição de estudo farmacocinético em humanos e enveredamento pelas fases clínicas, perseguindo o objetivo da descoberta de novos fármacos contra a TB.

4.2.5. Pipeline: Fluxograma de atividades biológicas na pesquisa de novos fármacos anti-TB

O trabalho possibilitou esquematizar dentro de um fluxograma de atividades biológicas em pesquisa de novos fármacos contra TB, um *pipeline* próprio, racional, seguro e reprodutível (**Figura 9**). Este *pipeline* propiciará a busca de produtos com atividade anti-TB em potencial, a partir de produtos naturais ou compostos sintéticos de síntese orgânica ou inorgânica baseado em análogos ou síntese de novos compostos.

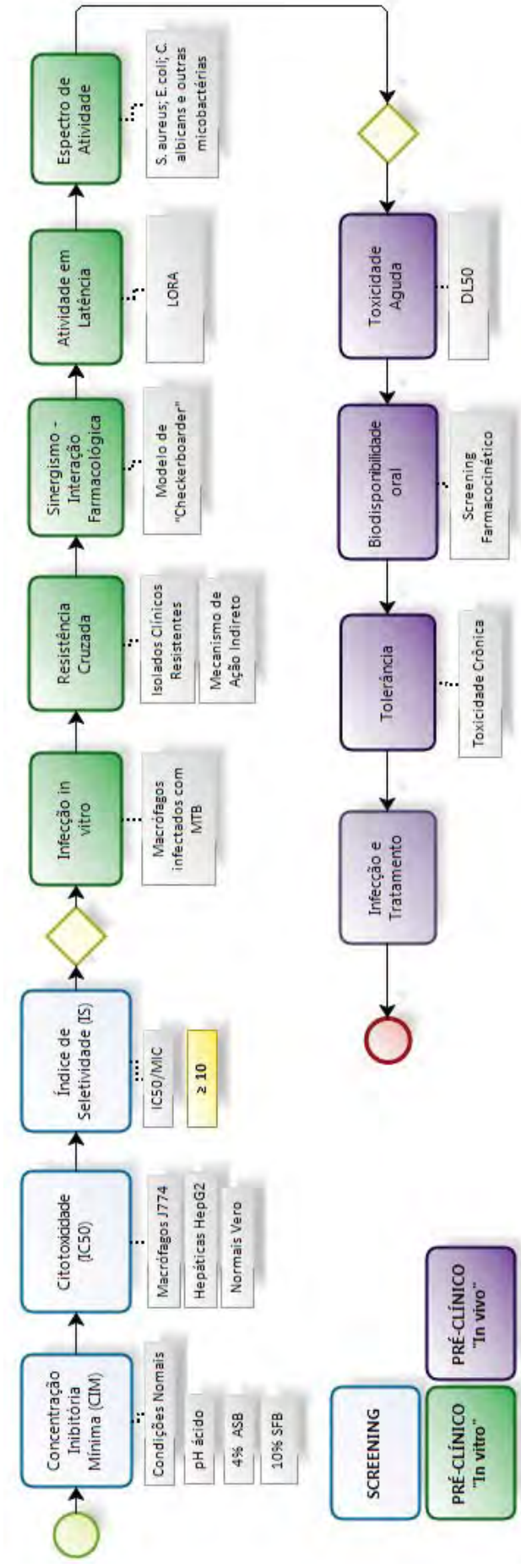


Figura 9. Pipeline: Pesquisa de novos fármacos anti-TB, Laboratório "Prof. Dr. Hugo David" FCFAR/UNESP Araraquara.

4.2.5.1. Parâmetros de permanência ou exclusão dos compostos no *pipeline*

4.2.5.1.a. Screening: Os parâmetros da fase de *screening* são apresentados na **tabela 9**. Esta fase compreende determinações do CIM, da citotoxicidade e do IS. Compostos com atividade anti-MTB promissora (**ver tabela 9**), serão selecionados para a próxima etapa, que consiste em avaliar a citotoxicidade (IC₅₀) frente a culturas de macrófagos J774A.1 (ATCC-TIB67), hepáticas HepG2 (ATCC HB8065) e epiteliais normais VERO (ATCC CCL81) (PAVAN et al. 2010). E finalmente determinado o Índice de Seletividade (IS) que consiste na razão entre o IC₅₀ e a CIM. Compostos com IS ≥10 serão selecionados para a etapa de ensaios pré-clínicos *in vitro*, considerando que estes apresentam segurança terapêutica

Tabela 9. Critérios de seleção da primeira etapa (*screening*) que indicarão os compostos que seguem no *pipeline* daqueles que não seguem. Esses poderão ser descontinuados ou alterados e novamente avaliados.

Compostos/ Ensaio	Extrato bruto	Fração do extrato bruto	Composto isolado da fração	Composto sintético análogo	Composto sintético nova estrutura
CIM* (µg/mL)	< 128	< 64	< 10	< 10	< 10
IC ₅₀	≥ 10x CIM	≥ 10x CIM	≥ 10x CIM	≥ 10x CIM	≥ 10x CIM
IS	≥ 10	≥ 10	≥ 10	≥ 10	≥ 10

*Para o CIM nas outras situações (pH 6, 4%ASB e 10%SFB) será calculada a razão com o CIM apresentado na tabela e o valor não poderá ser superior à 2 diluições.

4.2.5.1.b. Ensaios Pré-Clínicos (*in vitro*): Na primeira avaliação será verificada a capacidade dos compostos em exercer atividade sobre o MTB recombinante H₃₇Rv (ATCC 27294) (pFCA-luxAB) internalizado nos macrófagos J774A.1 (SNEWIN et al. 1999; PAVAN 2009; PAVAN et al. 2011). Na sequência os compostos serão colocados frente a 12 isolados clínicos com perfil de resistência fenotípica e genotípica à INH e RMP (MIYATA et al. 2011), para análise da resistência cruzada. O próximo passo será avaliar a interação dos novos candidatos (*checkerboarder 2D*)

com os fármacos vigentes na terapia da TB (MOODY, 1992; LUNA-HERRERA et al. 2007). Os compostos selecionados nesta fase serão avaliados quanto a sua capacidade de atuar sobre os bacilos dormentes. Para tal, será utilizado o modelo de Wayne (WAYNE 1994) para induzir estado de latência do MTB e o ensaio do LORA (*Low Oxygen Recovery Assay*) para avaliar a ação dos compostos sobre estes bacilos dormentes (CHO et al. 2007). Como última etapa o espectro de atividade será determinado de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; 2009).

Tabela 10. Critérios de seleção da segunda etapa (pré-clínico *in vitro*) que indicarão os compostos que seguem no *pipeline* daqueles que não seguem. Esses poderão ser descontinuados ou alterados e novamente avaliados.

Compostos/ Ensaio	Extrato bruto	Fração do extrato bruto	Composto isolado da fração	Composto sintético análogo	Composto sintético nova estrutura
Infecção <i>in vitro</i>	sce*	sce	sce	sce	sce
Resistência cruzada	sce	sce	sce	ativo**	sce
Interação farmacológica	sinérgico/ neutro	sinérgico/ neutro	sinérgico/ neutro	sinérgico/ neutro	sinérgico/ neutro
Latência	sce	sce	sce	sce	sce
Espectro de atividade	sce	sce	sce	sce	sce

*sce – sem critério de exclusão. A não atividade dos compostos nessas avaliações não denotará caráter de exclusão dos mesmos.

**O composto será excluído ou necessitará de alterações, pois resultado de não atividade nesse momento denota resistência cruzada com o composto o qual foi a estrutura base.

4.2.5.1.c. Ensaio *in vivo*: Para início de todos os experimentos será determinada a margem de segurança terapêutica, de acordo com o estabelecido pelo OECD (*Organization for Economic Co-operation Development*) através do método clássico de toxicidade aguda (DL₅₀) por dose única via oral (gavagem) dos compostos (OECD 2001). Em seguida será realizado o estudo da farmacocinética dos compostos através do estudo da biodisponibilidade oral (GRUPPO et al. 2006).

Compostos que fornecerem resultados favoráveis serão avaliados quanto a sua inocuidade (toxicidade crônica) em modelo animal, observando o nível de tolerabilidade, quando da sua administração diária semanal. Concluída esta etapa, finalmente, os animais serão infectados via intranasal com o MTB Erdmann (ATCC 35801) (FALZARI et al. 2005) e após, submetidos ao tratamento oral com os novos compostos, por duas semanas, sendo no final do ensaio, avaliada a redução da carga bacilar dos pulmões com o cultivo dos bacilos viáveis (FALZARI et al. 2005).

Tabela 11. Critérios de seleção da última etapa (pré-clínico *in vivo*) que selecionarão os compostos do *pipeline* para a triagem clínica daqueles que não seguirão. Esses poderão ser descontinuados ou alterados e novamente avaliados.

Composto/ Ensaio	Extrato bruto	Fração do extrato bruto	Composto isolado da fração	Composto sintético análogo	Composto sintético nova estrutura
Toxicidade aguda	baixa/ inócua	baixa/ inócua	baixa/ inócua	baixa/ inócua	baixa/ inócua
Tolerabilidade	baixa/ inócua	baixa/ inócua	baixa/ inócua	baixa/ inócua	baixa/ inócua
Biodisponibilidade Oral*	ativa	ativa	ativa	ativa	ativa
Tratamento	ativo	ativo	ativo	ativo	ativo

*Este ensaio é pré-requisito para o seguinte, onde aqui os compostos ou seu produtos devem mostrar atividade na corrente circulatória.

5. CONCLUSÃO

O *pipeline* baseado em ensaios fenotípicos utilizado para análise dos complexos mostrou ser rápido, sensível, específico e de baixo custo na pesquisa de um novo fármaco contra TB. Os ensaios realizados no Institute for Tuberculosis Research (ITR-E.U.A.) vêm sendo implantados no laboratório e o *pipeline* será novamente validado com os compostos metálicos que estão sendo sintetizados com base nos resultados deste trabalho utilizando os *lead compounds* como modelo estrutural.

Os resultados biológicos em modelos *in vitro* dos compostos heteroléticos de Ru(II) com fosfinas, diiminas e picolinatos como ligantes foram extremamente promissores com resultados melhores e/ou comparáveis aos fármacos de primeira escolha. Dentro dos resultados encontrados, os compostos responderam a algumas aplicações as quais um novo fármaco contra TB deve apresentar, como atividade em bactérias latentes, atividade em isolados MDR além de não interagirem negativamente com outros fármacos do atual tratamento.

A explicação da falta de atividade no modelo *in vivo* apresentada pelos compostos de Ru, explicada pela ausência na redução da carga bacilar pulmonar dos camundongos infectados, foi obtida pelo ensaio de biodisponibilidade oral. Os resultados indicaram que os compostos **SCAR** não alcançaram concentrações suficientemente ativas na corrente sanguínea, pois ou sofrem degradação ou, caso alcancem a corrente circulatória, não estão na forma ativa. Entretanto, os resultados encontrados aqui apontaram esses compostos como compostos líderes (*lead compounds*). A somatória dos dados encontrados *in vitro* e *in vivo* indicou pela primeira vez os compostos de Ru(II) contendo esses ligantes como uma nova classe de compostos inorgânicos que podem se tornar agentes anti-TB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAPELA, N. B.; LALL, N.; FOURIE, P. B.; FRANZBLAU, S. G.; VAN RENSBURG, C. E. Activity of 7-methyljuglone in combination with antituberculous drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 9, p. 630-635, 2006.

BERNHARDT, P. V.; WILSON G. V.; SHARPE, P.C.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Tuning the antiproliferative activity of biologically active iron chelators: characterization of the coordination chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 107-119, 2008.

CHEN, P.; GEARHART, J.; PROTOPOPOVA, M.; EINCK, L.; NACY, C. A. Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 332-337, 2006.

CHO, S. H.; WARIT, S.; WAN, B.; HWANG, C. H.; PAULI, G. F.; FRANZBLAU, S. G. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1380-1385, 2007.

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, seventh edition. Approved standard M7-A8. CLSI, Wayne, PA, 2009.

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal testing of yeast, third edition. Approved standard M7-A3. CLSI, Wayne, PA, 2008.

CONDE, M. B.; MELO, F. A. F.; MARQUES, A. M. C.; CARDOSO, N. C.; PINHEIRO, V. G. F.; DALCIN, P. T. R.; JUNIOR, A. M.; LEMOS, A. C. M.; NETTO, A. R.; DUROVNII, B.; SANT'ANNA, C. C.; LIMA, D.; CAPONE, D.; BARREIRA, D.; MATOS, E. D.; MELLO, F. C. Q.; DAVID, F. C.; MARSICO, G.; AFIUNE, J. B.; SILVA, J. R. L.; JAMAL, L. F.; TELLES, M. A. S.; HIRATA, M. H.; DALCOLMO, M. P.; RABAHI, M. F.; CAILLEAUX-CESAR, M.; PALACI, M.; MORRONE, N.; GUERRA, R. L.; DIETZE, R.; MIRANDA, S. S.; CAVALCANTE, S. C.; NOGUEIRA, S. A.; NONATO, T. S. G.; MARTIRE, T.; GALES, V. M. N.; DETTONI, V. V. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. **Brazilian Journal of Pneumology**, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E. 3rd.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the

biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 396, n. 6707, p. 190-198, 1998.

COLLINS, L. A. e FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 1004-1009, 1997.

DAFFE, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. In: (Ed.). **Advances in Microbial Physiology**, v.39, 1998. p.131-203. (Advances in Microbial Physiology). ISBN 0065-2911.

DEPARDIEU, F.; PODGLAJEN, I.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 79, 2007.

DHARMARAJ, N.; VISWANATHAMURTHI, P.; NATARAJAN, K. Ruthenium(II) complexes containing bidentate Schiff bases and their antifungal activity. **Transition Metal Chemistry**, v. 26, n. 1-2, p. 105-109, 2001.

FALZARI, K.; ZHU, Z.; PAN, D.; LIU, H.; HONGMANEE, P.; FRANZBLAU, S. G. *In vitro* and *in vivo* activities of macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1447-1454, 2005.

FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; MCLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, V. K.; FERGUSON, R. M.; GILMAN, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 362-366, 1998.

GANDHI, N. R.; NUNN, P.; DHEDA, K.; SCHAAF, H. S.; ZIGNOL, M.; VAN SOOLINGEN, D.; JENSEN, P.; BAYONA, J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. **Lancet**, v. 375, n. 9728, p. 1830-1843, 2010.

GOLDMAN, R.C.; PLUMLEY, K.V.; LAUGHTON, B.E. The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 7, p. 73-91, 2007.

GRUPPO, V.; MARIETTA, K. S.; SCHERMAN, H.; ZINK, E. E.; CRICK, D. C.; ADAMS, L. B.; ORME, I. M.; LENAERTS, A. J. Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1245-1250, 2006.

Handbook of anti-tuberculosis agents. **Tuberculosis**, v. 88, n. 2, p. 85-169, 2008.

HEYM, B.; HONORÉ, N.; TRUFFOT-PERNOT, C.; BANERJEE, A.; SCHURRA, C.; JACOBS, W. R. JR.; VAN EMBDEN, J. D.; GROSSET, J. H.; COLE, S. T.

Implications of multidrug-resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis - a molecular study. **Lancet**, v. 344, n. 8918, p. 293-298, 1994.

HUNTER, J. H.; GUJJAR, R.; PANG, C. K. T.; RATHOD, P. K. Kinetics and ligand-binding preferences of *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate synthases, ThyA and ThyX. **Plos One**, v. 3, n. 5, 2008.

KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N. GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483-490, 2011.

LALLOO, U. G. e AMBARAM, A. New antituberculous drugs in development. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 7, n. 3, p. 143-151, 2010.

LEBWOHL, D. e CANETTA, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 10, p. 1522-1534, 1998.

LENAERTS, A. J.; GRUPPO, V.; MARIETTA, K. S.; JOHNSON, C. M.; DRISCOLL, D. K.; TOMPKINS, N. M.; ROSE, J. D.; REYNOLDS, R. C.; ORME, I. M. Preclinical testing of the nitroimidazopyran PA-824 for activity against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of *in vitro* and *in vivo* models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2294-2301, 2005.

LIENHARDT, C.; VERNON, A.; RAVIGLIONE, M. C. New drugs and new regimens for the treatment of tuberculosis: review of the drug development pipeline and implications for national programmes. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 3, p. 186-193, 2010.

LOMOVSKAYA, O. e BOSTIAN, K. A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 910-918, 2006.

LUNA-HERRERA, J.; COSTA, M. C.; GONZÁLEZ, H. G.; RODRIGUES, A. I.; CASTILHO, P. C. Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 548-552, 2007.

LUNA-HERRERA, J.; MARTÍNEZ-CABRERA, G.; PARRA-MALDONADO, R.; ENCISO-MORENO, J. A.; TORRES-LOPEZ, J.; QUESADA-PASCUAL, F.; DELGADILLO-POLANCO, R.; FRANZBLAU, S. G. Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 21-27, 2003.

MA, Z. K.; LIENHARDT, C.; MCLLERON, H.; NUNN, A. J.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2100-2109, 2010.

MADISON, B.; ROBINSON-DUNN, B.; GEORGE, I.; GROSS, W.; LIPMAN, H.; METCHOCK, B.; SLOUTSKY, A.; WASHABAUGH, G.; MAZUREK, G.; RIDDERHOF, J. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3976-3979, 2002.

MAIA, P. I. S.; GRAMINHA, A.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; BATISTA, A. A.; BACK, D. F.; LANG, E. S.; ELLENA, J.; LEMOS, S. S.; SALISTRE-DE-ARAUJO, H.; DEFLON, V. M. Palladium(II) complexes with thiosemicarbazones. Syntheses, characterization and cytotoxicity against breast cancer cells and Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1177-1186, 2010.

MAIA, P. I. S.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; LEMOS, S. S.; SOUSA, G. F.; BATISTA, A. A.; NASCIMENTO, O. R.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; NIQUET, E.; DEFLON, V. M. Vanadium complexes with thiosemicarbazones: Synthesis, characterization, crystal structures and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Polyhedron**, v. 28, n. 2, p. 398-406, 2009.

MANABE, Y. C. e BISHAI, W. R. Latent *Mycobacterium tuberculosis* - persistence, patience, and winning by waiting. **Nature Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1327-1329, 2000.

MARTIN, A.; MORCILLO, N.; LEMUS, D.; MONTORO, E.; TELLES, M. A.; SIMBOLI, N.; PONTINO, M.; PORRAS, T.; LEÓN, C.; VELASCO, M.; CHACON, L.; BARRERA, L.; RITACCO, V.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 8, p. 901-906, 2005.

MEENA, L. S. e RAJNI. Survival Mechanisms of Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. **The FEBS Journal**, v. 227, n. 11, p. 2416-2427, 2010.

MITCHISON, D. A. Treatment of tuberculosis - the mitchell lecture 1979. **Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 14, n. 2, p. 91, 1980.

MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; MARINO, L. B.; HIRATA, M. H.; CARDOSO, R. F.; MELO, F. A.; ZANELLI, C. F.; LEITE, C. Q. F. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic methods. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 456-459, 2011.

MOODY, J. A. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: HD, I. (Ed.). **Clinical microbiology procedures handbook**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992. p.1-28.

MUNOS, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 12, p. 959-968, 2009.

NASCIMENTO, F.; VON POELHSITZ, G.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; LEITE, C. Q. F.; SALISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A. Synthesis, characterization, X-ray structure and *in vitro* anti

mycobacterial and antitumoral activities of Ru(II) phosphine/diimine complexes containing the "SpymMe(2)" ligand, SpymMe(2)=4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 9, p. 1783-1789, 2008.

NIKONENKO, B. V.; PROTOPOPOVA, M.; SAMALA, R.; EINCK, L.; NACY, C. A. Drug therapy of experimental tuberculosis (TB): Improved outcome by combining SQ109, a new diamine antibiotic, with existing TB drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1563-1565, 2007.

OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Acessado em 18 de dezembro 2008 em <http://www.oecd.org/publications>. Paris: Head of Publications Service.

OLIVEIRA, J. S.; SOUZA, E. H.; SOUZA, O. N.; MOREIRA, I. S.; SANTOS, D. S.; BASSO, L. A. Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 19, p. 2409-2424, 2006.

ORME, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. 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.

PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S. R.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.

PAVAN, F. R.; VON POELHSITZ, G.; NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R.; BATISTA, A. A.; DEFLON, V. M.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 598-601, 2010.

PAVAN, F. R. **Atividade Anti-*Mycobacterium tuberculosis* intra e extracelular e citotoxicidade dos complexos de rutênio e vanádio e seus ligantes**. 2009. 116 (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.

PAVAN, F. R.; VON POELHSITZ, G.; BARBOSA, M. I.; LEITE, S. R.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V.; GAMBINO, D.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 5099-5107, 2011.

PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; LEITE, C. Q. F. An approach to the search for new drugs against tuberculosis. In: CARDONA, P.-J. (Ed.). ***Mycobacterium tuberculosis/book 2***: Intech, 2011. ISBN 979-953-307-697-2.

PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; POMPLIANO, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 29-40, 2007.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382, 2006.

POETA, M. D.; CRUZ, M. C.; CARDENAS, M. E.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Synergistic antifungal activities of bafilomycin A₁, fluconazole, and the pneumocandin MK-0991/caspofungin acetate (L-743,873) with calcineurin inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 739-746, 2000.

ROSSI, E.; AINSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **Fems Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 36-52, 2006.

RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: Here today, and here tomorrow. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. 569-577, 2001.

NAVARRO, M.; VÁSQUEZ, F.; SANCHEZ-DELGADO, R. A.; PEREZ, H.; SINOUE, V.; SCHREVEL, J. Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 276, n. 1-2, p. 528-540, 1998.

SANTOS, J.; YAMASAKI, P. R.; CHIN, C. M.; TAKASHI, C. H.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F. Synthesis and *in vitro* anti *Mycobacterium tuberculosis* activity of a series of phthalimide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 3795-3799, 2009.

SHAIENDRA, N. S.; BHARTI, N.; GARZA, M. T. G.; CRUZ-VEGA, D. E.; GARZA, J. C.; SALEEM, K.; NAQVI, F.; AZAM, A. Synthesis, characterisation and antiamebic activity of new thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives and their cyclooctadiene Ru(II) complexes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 20, p. 2675-2678, 2001.

SNEWIN, V. A.; GARES, M. P.; GAORA, P. O.; HASAN, Z.; BROWN, I. N.; YOUNG, D. B. Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4586-4593, 1999.

SRIRAM, D.; YOGEEESWARI, P.; DEVAKARAM, R. V. Synthesis, *in vitro* and *in vivo* antimycobacterial activities of diclofenac acid hydrazones and amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 3113-3118, 2006.

STOVER, C. K.; WARRENER, P.; VANDEVANTER, D. R.; SHERMAN, D. R.; ARAIN, T. M.; LANGHORNE, M. H.; ANDERSON, S. W.; TOWELL, J. A.; YUAN, Y.; MACMURRAY, D. N.; KREISWIRTH, B. N.; BARRY, C. E.; BAKER, W. R. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 962-966, 2000.

SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 7, p. 507-519, 2011.

TARALLO, M.; URQUIOLA, C.; MONGE, A.; COSTA, B. P.; RIBEIRO, R. R.; COSTA-FILHO, A. J.; MERCADER, R. C.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; TORRE, M. H.; GAMBINO, D. Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 11, p. 1164-1170, 2010.

TOMIOKA, H. Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 21-49, 2008.

TRIPATHI, R. P.; TEWARI, N.; DWIVEDI, N.; TIWARI, V. K. Fighting tuberculosis: An old disease with new challenges. **Medical Research Reviews**, v. 25, n. 1, p. 93-131, 2005.

TWEEDY, B. G. e TURNER, N. Effect of dacthal on soil microorganisms. **Phytopathology**, v. 55, n. 10, p. 1080-1098, 1965.

WAYNE, L. G. Dormancy of *Mycobacterium-tuberculosis* and latency of disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 908-914, 1994.

WAYNE, L. G. e HAYES, L. G. An *in vitro* model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 2062-2069, 1996.

WAYNE, L. G. e SOHASKEY, C. D. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 139-163, 2001.

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing [2008]. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/fullreport.pdf

Working Group on New TB Drugs (WGNT). Pipeline [2011]. Disponível em: <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>

WONG, E. e GIANDOMENICO, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2451-2466, 1999.

YING, Z. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 529-564, 2005.

ZHANG, L. Y.; ZHENG, Y.; CALLAHAN, B.; BELFORT, M.; LIU, Y. Cisplatin inhibits protein splicing, suggesting inteins as therapeutic targets in mycobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1277-1282, 2011.

ZHANG, Y.; WADE, M. M.; SCORPIO, A.; ZHANG, H.; SUN, Z. 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.

ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver-Operating Characteristic (ROC) plots - a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 561-577, 1993.

CAPÍTULO II



Original article

Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis

Fernando R. Pavan^{a,*}, Gustavo V. Poelhsitz^b, Marília I.F. Barbosa^c, Sergio R.A. Leite^d, Alzir A. Batista^{c,**}, Javier Ellena^e, Leticia S. Sato^a, Scott G. Franzblau^f, Virtudes Moreno^g, Dinorah Gambino^h, Clarice Q.F. Leite^{a,*}

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, CEP 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

^d Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CEP 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

^e Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

^f Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA

^g Department de Química Inorgànica, Universitat de Barcelona, Martí y Franquès 1-11, 08028, Barcelona, Spain

^h Cátedra de Química Inorgànica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de La República, Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2011

Received in revised form

16 August 2011

Accepted 16 August 2011

Available online 23 August 2011

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis

Drug resistance

Ruthenium

Phosphine/diimine/picolinate

ABSTRACT

This paper describes the synthesis and characterization of four new ruthenium complexes containing 1,4-bis(diphenylphosphino)butane (dppb), 2-pyridinecarboxylic acid anion (pic) and the diimines [(2,2'-bipyridine (bipy), 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (Me-bipy), 4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine (Cl-bipy) and 1,10-phenanthroline (phen) as ligands, with formulae [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (**SCAR01**), [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (**SCAR02**), [Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF₆ (**SCAR03**) and [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (**SCAR04**). Additionally, the *in vitro* anti-*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) activity, cytotoxicity and activity against *in vitro* infection of these complexes and two more complexes, *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**SCAR05**) and *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (**SCAR06**), and their free ligands are described and discussed. All compounds showed excellent MIC against MTB, low cytotoxicity and a selectivity index higher than 10. Also, all compounds showed significant intracellular inhibition and the compound **SCAR05** showed a better activity than rifampin and SQ109. This is the first report of activity against *in vitro* infection of ruthenium compounds.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The tuberculosis (TB) mortality rates decreased globally in 2007, with 1.3 million HIV-negative TB patients dying in 2007 and 456,000 deaths among individuals infected with both TB and HIV. However, in 2007 there were an estimated 9.27 million incident cases of TB, the majority of which occurred in Asia and Africa. This is an increase from the previous year, when 9.24 million cases were recorded [1]. In addition, the highly drug-resistant organisms are virtually untreatable in immunocompetent patients, so when these organisms enter into contact with highly immunocompromised HIV-infected populations, the mortality rate within a few weeks of

infection approaches 100% [2]. In the last 40 years, no new drugs have been developed specifically against mycobacteria [3] and, only in the last few years, some promising candidate drugs are being tested in the preclinical phase [4]. Thus, there is a great need to develop new therapeutic agents to treat tuberculosis, so as to reduce the total duration of treatment and to provide more effective treatment against multidrug resistance (MDR), extensive drug resistance (XDR) and latent tuberculosis infection [5]. There are currently two main approaches to developing a new anti-TB drug [6]. One of them is based on the synthesis of analogues of existing drugs, with the aim of shortening and improving TB treatment. The other involves a search for novel structures with which mycobacteria have never been challenged before [7]. Adopting this second approach, our research is focused on the synthesis and characterization of new compounds, specifically new metal complexes.

Medicinal chemistry is taking a growing interest in the development of metal complexes for use as drugs or diagnostic agents.

* Corresponding authors. Tel.: +55 16 33016953.

** Corresponding author. Tel.: +55 16 33518285.

E-mail addresses: pavanfer@yahoo.com.br (F.R. Pavan), daab@power.ufscar.br (A.A. Batista), leitecqf@cfar.unesp.br (C.Q.F. Leite).

Owing to their wide spectrum of coordination numbers and geometries, as well as kinetic properties, metal compounds offer mechanisms of drug action that cannot be realized by organic agents [7,8]. Ruthenium compounds have already exhibited potential anti-tumour activity since the 1970s and 1980s, and, more recently, the Ru(III) complexes NAMI-A and KP 1019 (FFC14a) have entered clinical trials. Recent studies have indicated that the anti-tumour activity of Ru(III) complexes also depends on their reducibility to Ru(II) species. The *in vitro* activity of a homologous series of Ru(III) complexes increased with increasing ease of reduction [8].

In this laboratory, we have studied and reported on the anti-*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) activity of several new complexes containing various metals [3,7,9–14]. Specifically, Ru(II) complexes have shown excellent activity against *in vitro* MTB, being up to 150 times more active than their free ligands 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine; 1,4 bis(diphenylphosphino)butane; 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, bis(diphenylphosphino) methane, triphenylphosphine, 2,2'-bipyridine, 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine, 2-pyridinecarboxylic acid and, interestingly, in these complexes the activity was higher, when they contained three chelated ligands, than that of the precursor complexes containing two chelated and two chloride ligands [9,14].

This paper describes the synthesis and characterization of four new ruthenium(II) complexes containing 1,4 bis(diphenylphosphino)butane (dppb), the 2-pyridinecarboxylic acid anion (pic) and diimines (bipy, Me-bipy, Cl-bipy and phen) as ligands, with formulae [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (**SCAR01**), [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (**SCAR02**), [Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF₆ (**SCAR03**) and [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (**SCAR04**). Additionally, the *in vitro* anti-*M. tuberculosis* (MTB) activity, cytotoxicity and activity against *in vitro* infection of these complexes and two more complexes, *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**SCAR05**) and *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (**SCAR06**) [9,15], and their free ligands are presented and discussed.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of the complexes

The chemical reactivity of the 2-pyridinecarboxylic acid (Hpic) ligand with complexes such as *cis*-[RuCl₂(dppb)(N-N)] [15] enabled the synthesis of complexes with the general formula [Ru(pic)(dppb)(N-N)]PF₆ (N-N = bipy, Me-bipy, Cl-bipy or phen), containing three chelated ligands, under mild conditions, by simple chloride exchange (see Scheme 1).

2.2. Structural studies

The X-ray structure of **SCAR01** was determined and an ORTEP view showing the atom numbering scheme is shown in Fig. 1. Selected bond lengths and angles are presented in Table 1. The crystal structure of the complex consists of separate discrete molecular units and solvated water molecules (w). Complex

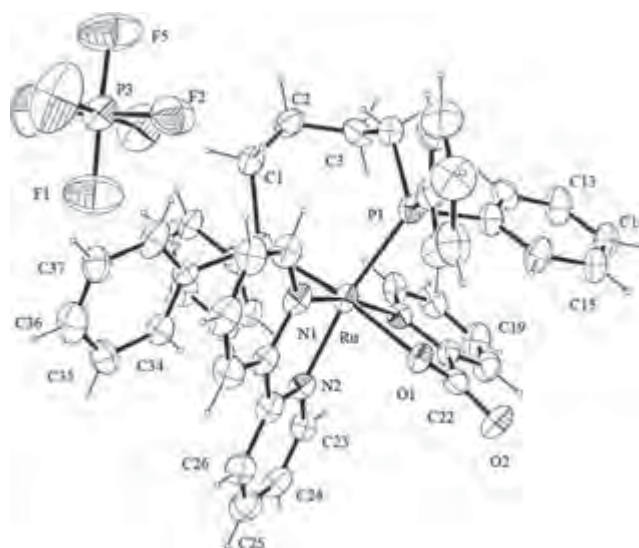


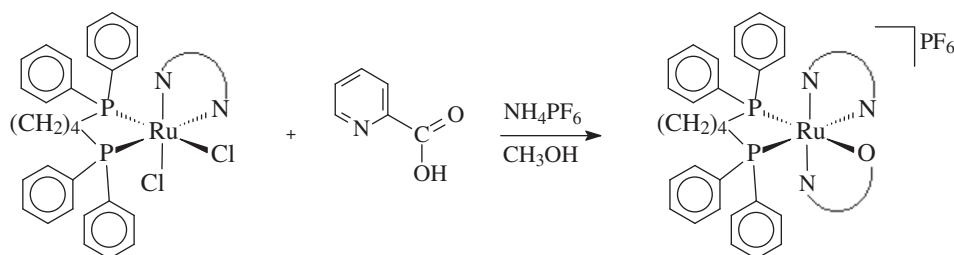
Fig. 1. ORTEP view of the cation complex [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆·2H₂O (**SCAR01**) showing the labels and 50% probability ellipsoids of the atoms. The solvent molecules were omitted.

SCAR01 crystallizes in the monoclinic system, space group P2₁/n, the Ru center being coordinated by three bidentate ligands in a distorted octahedral geometry as shown by the angles around the metal ion, listed in Table 1. One phosphorus atom is disposed *trans* to one nitrogen atom of the bipy and the other *trans* to the oxygen of the pic ligand.

The Ru–P bond lengths of 2.3256(18) and 2.350(2) Å are within the normal range found for Ru(II) tertiary phosphine complexes [15–19]. The P–Ru–P angle in the seven-member ring of dppb is 99.36(7)°, comparable with the values previously observed for the precursor **SCAR05** [15]. The average Ru–N (bipy) distance of 2.099 Å in complex **SCAR01** is also similar to that observed in **SCAR05** (2.09 Å) [15]. The Ru–N(3) and Ru–O(1) distances of the pic ligand, of 2.116(5) and 2.132(5) Å, respectively, are similar to those observed in other Ru(II) complexes containing this ligand [20,21]. The pic ligand dimensions in complex **SCAR01** (C(22)–O(1) = 1.274(9) Å, C(22)–O(2) = 1.219(9) Å) are consistent with deprotonation and coordination of the heterocycle to the Ru center [20,21]. The five-membered ring formed by the O-,N- chelating heterocyclic picolinate is inherently strained [20,21]. This is corroborated in **SCAR01** by the small O(1)–Ru–N(3) angle of 77.9(2)°.

2.3. Characterization of the compounds

The ³¹P{¹H} NMR spectra of complexes **SCAR01–4** in CH₂Cl₂/D₂O in a capillary presented typical AB spin systems exhibiting chemical shifts close to 39.0 (d) and 37.3 (d), with ²J_{P-P} = 33.5 Hz, indicating the magnetic nonequivalence of the two phosphorus atoms



Scheme 1. Synthesis of the ruthenium(II) compounds containing the pic ligand.

Table 1

Selected bond lengths (Å) and angles (°) for complex [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆·2H₂O with standard deviations in parentheses.

Ru–N(1)	2.088(6)	N(1)–Ru–N(2)	79.6(3)	N(3)–Ru–O(1)	78.3(2)
Ru–N(2)	2.094(7)	N(1)–Ru–N(3)	167.9(3)	O(1)–Ru–P(2)	172.30(17)
Ru–N(3)	2.112(6)	N(2)–Ru–N(3)	93.0(2)	O(1)–Ru–P(1)	87.96(18)
Ru–O(1)	2.122(5)	N(1)–Ru–O(1)	91.0(2)	N(1)–Ru–P(1)	96.0(2)
Ru–P(1)	2.347(3)	N(2)–Ru–O(1)	79.9(2)	N(2)–Ru–P(1)	166.99(17)
Ru–P(2)	2.324(2)	N(3)–Ru–O(1)	78.3(2)	N(3)–Ru–P(1)	89.1(2)
O(1)–C(22)	1.282(10)	N(1)–Ru–P(2)	85.60(18)	N(3)–Ru–P(2)	104.37(18)
O(2)–C(22)	1.211(11)	N(2)–Ru–P(2)	92.64(19)	P(2)–Ru–P(1)	99.25(9)

(complete data in Table 2). Precursor complexes of general formula *cis*-[RuCl₂(dppb)(N-N)] show a pair of doublets at 43.0 and 32.0 ppm, with ²J_{P-P} = 32.0 Hz, in their ³¹P{¹H} spectra [15,22]. In the precursors, the high-field doublet corresponds to the *P trans N*, as previously described [15]. These assignments are based on an empirical linear correlation established between the crystallographically determined Ru–P distances in a series of Ru-dppb complexes and the corresponding ³¹P chemical shifts observed in solution, in which the chemical shifts become more high-field with increasing Ru–P bond length [15,16,19]. In light of this information, we suggest that in the new complexes the high-field doublet belongs to the *P trans* nitrogen from bipy (N-N), because the Ru–P1 distance of 2.347(3) Å (*trans N-N*) is longer than that observed for the Ru–P2 *trans O* of the pic ligand (2.324(2) Å) (see Table 1).

The mass spectra (ESI-MS) of complexes **SCAR01–4**, delivered in a CH₂Cl₂ solution, showed the parent molecular ions at *m/z* values [M – PF₆]⁺ consistent with the assigned formulation (see experimental data). No fragmentation was observed under the experimental conditions described.

The IR spectra of the new complexes also confirmed the presence of the pic ligand coordinated to the Ru(II) center. Bands corresponding to the ν_{as}(COO) and ν_s(COO) vibrational modes appeared close to 1660 and 1334 cm⁻¹, respectively, for all complexes. The band attributable to ν(OH), which appeared at 3200–3100 cm⁻¹ in the free ligand spectrum, was absent in those of complexes **SCAR01–4**, indicating that the pic ligand is coordinated in the deprotonated form [23]. The electronic spectra of **SCAR01–4** complexes showed four absorptions in the UV region (two bands and two shoulders), assigned as intra-ligand transitions by means of comparison with the free ligands (dppb, N–N and pic). In the visible region, one band and a shoulder were observed, respectively close to 420 and 490 nm. These absorptions can be attributed to metal-to-ligand charge transfer transitions, probably involving both diimine (N–N) and pic ligands. The electrochemical behavior of these new complexes in cyclic voltammetric experiments was similar to that observed for their precursors [15,29]. A quasi-reversible one-electron Ru^{II}/Ru^{III} redox process was observed for each complex. As expected, the E_{1/2} values found for the new complexes were considerably more anodic than those observed for the respective precursors, by approximately 0.60 V (Table 2), indicating that the Ru center was more stable in the new derivatives than in their precursors. This stabilization is assumed to be due to

Table 2

³¹P{¹H} NMR and electrochemical data for complexes **SCAR01–4**.

Complex	δ (ppm)	E _{1/2} /V ^a	ΔE _p /V ^b	pKa (N-N)
SCAR01	P _A (37.8)/P _B (39.5)	1.21	0.21	4.44
SCAR02	P _A (37.2)/P _B (39.1)	1.14	0.17	4.92
SCAR03	P _A (36.8)/P _B (38.5)	1.32	0.19	2.61
SCAR04	P _A (38.0)/P _B (40.2)	1.22	0.13	4.27

^a Scan rate: 100 mV s⁻¹.

^b ΔE_p = E_{pa} – E_{pc}.

the replacement of two monoanionic donor chlorides by a single monocharged chelating pic unit, resulting in positively-charged product complexes [24]. Among the four new complexes, the E_{1/2} values clearly correlate with the diimine pKa values, such that the complex containing the most acidic ligand (Cl-bipy) showed the most stable ruthenium center (highest E_{1/2}).

2.4. Anti-*M. tuberculosis* activity assay

The *in vitro* anti-MTB activities of the free ligands and the phosphine-diimine-picolinate ruthenium complexes were tested against MTB H₃₇Rv ATCC 27294 and the MICs are reported in Table 3. The MICs of complexes **SCAR01–05** are comparable to or better than those of some “second” and “first” line drugs used in current therapy [6,25,26]. SQ 109, an antitubercular compound derived from ethambutol, with MIC of 1.56 μM [27], and TMC 207, a diarylquinoline with MIC of 0.81 μM [28], both of which are new promising drug candidates, presently in the human clinical trial phase, are examples of *in vitro* activity comparable to the ruthenium complexes presented here. Even though the complex **SCAR06** showed the worst inhibitory result among the tested compounds, it had activity comparable to or better than the “second” line drugs [25]. Comparing the complexes **SCAR01** and **SCAR06**, we observe that **SCAR01** is 5.5 times more active than **SCAR06**, probably due to the absence of the Hpic ligand in the latter. The ligands dppe and phen are the only ones that have good MICs (15.70 and 11.80 μM respectively). However, these values are respectively 71 and 16 times higher than those of their complexes.

2.5. *In vitro* cytotoxicity

The cytotoxicity results (Table 3), expressed as the IC₅₀ for the J774A.1 cell line, show that all of the tested ruthenium complexes exhibited low cytotoxicity (IC₅₀ ranging from 3.4 to 104 μM). The free ligands are also not very cytotoxic (IC₅₀ ranging from ≤50 to 2538 μM). The selectivity index (SI) of each compound was determined as the ratio of IC₅₀ to MIC (Table 3). According to Orme et al. [29], candidates for new drugs must have an index equal to or higher than 10, together with MIC lower than 6.25 μg/mL (or the molar equivalent) and a low cytotoxicity. SI is used to estimate the therapeutic window of a drug and to identify drug candidates for further studies. Thus, all the ruthenium complexes studied here, with SI ranging from 15.20 to 40.10, are very promising new anti-tuberculosis drug candidates, and therefore they were all tested in the *in vitro* infection model [29].

2.6. *In vitro* infection model

The *in vitro* intracellular activities of the phosphine-diimine-picolinate ruthenium complexes were tested against MTB Erdmann (ATCC 35801) containing the Luciferase Plasmid and the inhibitory values are reported in Table 4. The compounds were tested in macrophages at those concentrations: at their MICs and 4 times higher and lower. All complexes presented significant intracellular activity at various concentrations. The complexes **SCAR02** and **SCAR05** were the most active because they showed the best activity at lower concentrations (0.13 μM = 70.50% inhibition and 0.06 μM = 47.60% inhibition, respectively). These complexes also exhibited the best activity at concentrations equal to and higher than the MIC. The comparison between the intracellular activity of compound **SCAR05** and rifampin (Table 4) showed a higher activity in the new compound. Additionally, the intracellular activities of compounds **SCAR01–05** are better than those of 26 synthesized compounds from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines, and comparable to SQ 109 (4.72 μM = 99% intracellular inhibition),

Table 3
Anti-MTB activity (MIC), cytotoxicity (IC₅₀), and selectivity index (SI) of the ruthenium complexes and their free ligands.

Identification	Compounds	MIC		IC ₅₀		SI
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	IC ₅₀ /MIC
SCAR01	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	0.91	0.95	31.30	32.60	34.20
SCAR02	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	0.49	0.50	11.70	11.90	23.90
SCAR03	[Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF ₆	0.78	0.76	31.30	30.40	40.10
SCAR04	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	0.63	0.74	19.50	23	31.20
SCAR05	cis-[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	0.26 ^a	0.22 ^a	3.90	3.35	15.20
SCAR06	cis-[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	3.90 ^a	5.17 ^a	78.20	104	20.10
Ligand	Hpic	> 50 ^a	>406 ^a	312.50	2538	≤ 6.25
Ligand	dppb	> 50 ^a	>117.20 ^a	625	1465	≤ 12.50
Ligand	dppe	6.25 ^a	15.70 ^a	156.30	392.6	25
Ligand	phen	2.34	11.80	≤ 9.80	≤ 50	≤ 4.20
Ligand	bipy	25 ^a	160.10 ^a	≤ 9.80	≤ 63	≤ 0.40
Ligand	Me-bipy	25 ^a	135.70 ^a	≤ 9.80	≤ 53.20	≤ 0.40
Ligand	Cl-bipy	25	111.06	19.50	86.63	0.78

^a Data reported previously [9,14].

which is the best compound in this library [27]. On the other hand, the compound **SCAR06** showed low intracellular activity at 1.29 µM (19.40%), compared to the similar compound **SCAR01**, with 55.10% inhibition at a concentration of 0.95 µM (Table 4). This finding corroborates the previous observation about the importance of the presence of Hpic in the complex structure, to intensify the anti-tuberculosis activity.

2.7. In vitro structure–activity–relationship (SAR)

Indeed, although Hpic is the ligand with the lowest activity among the tested ligands against MTB, its presence in the ruthenium complexes increased both extra and intracellular activities. For example, the substitution of the two Cl atoms by Hpic in the cis-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (**SCAR06**), resulting in [Ru(pic)(dppb)(-bipy)]PF₆ (**SCAR01**), increased the anti-TB activity five times. Therefore, it is likely that the structures of the complexes are responsible for the properties of the compounds, and important for their mechanism of action as tuberculostatics. The structural changes probably affect the reaction of the complexes with bacterial DNA, which is the likely target of these drugs. It is known

that the interaction with DNA is the basis of the cytostatic effect of ruthenium compounds [30–32] and this interaction is modulated by the nature of the ligands present in the complexes. In the present case, the smaller partial electronic charge on the free oxygen atom of the pic ligand, in comparison with the charges on the chlorine atoms of the original compound [33], makes the former the worst hydrogen bond acceptor. This could be associated with a higher cytotoxicity [32] and probably the anti-MTB effect follows the same trend.

In order to preliminary address if interaction with DNA could be part of the mode of action of the complexes, experiments with CT DNA were carried out. Binding of **SCAR01** to DNA was studied by combining atomic absorption determinations (for the metal) and electronic absorption measurements for DNA quantification. The complex showed a negligible covalent binding level to CT DNA (nmol Ru/mg DNA base pairs ≈ 0). Interaction with DNA was further explored through circular dichroism technique, viscosity measurements and atomic force microscopy (AFM). In Fig. 2, the circular dichroism spectra of **SCAR01** at several ruthenium complex: DNA molar ratios are shown. After 24 h of incubation at 37 °C, changes in molar ellipticity can be observed for the complex.

Table 4
Intracellular activity against MTB Erdmann ATCC 35801 with pSMT1 plasmid, of ruthenium compounds and rifampin at various concentrations.

Identification	Compounds	Concentrations Range		Intracellular inhibitory activities (%)
		µg/mL	µM	
SCAR01	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	3.64	3.80	77.50
		0.91	0.95	55.10
		0.23	0.24	48.30
SCAR02	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	1.96	2	82.30
		0.49	0.50	73.30
		0.12	0.13	70.50
SCAR03	[Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF ₆	3.12	3.04	62.30
		0.78	0.76	43.30
		0.20	0.19	31.90
SCAR04	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	2.52	2.96	78.90
		0.63	0.74	75.30
		0.16	0.19	65.90
SCAR05	cis-[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	1.04	0.88	85.20
		0.26	0.22	80.50
		0.07	0.06	47.60
SCAR06	cis-[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	15.6	20.70	51.10
		3.90	5.17	33.40
		0.98	1.29	19.40
RMP	Rifampin	0.40	0.49	80.40
		0.10	0.12	51.50
		0.03	0.04	24

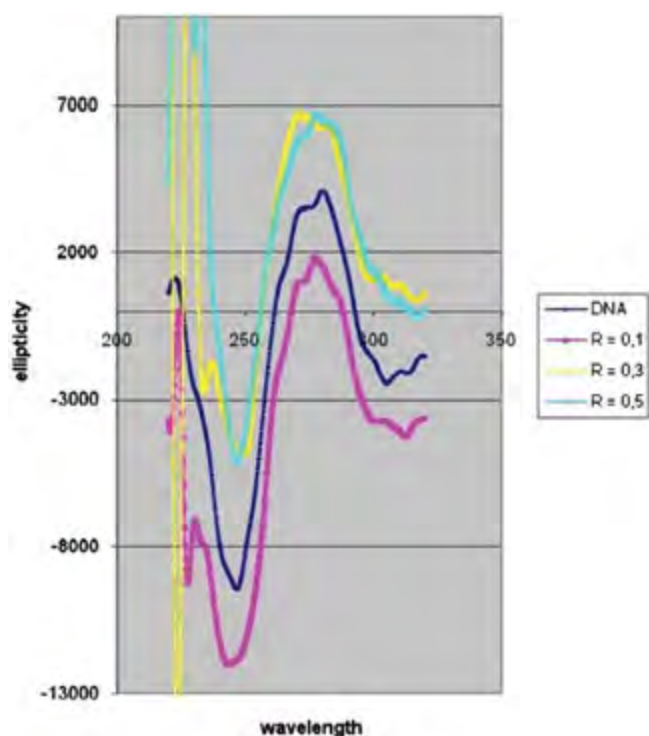


Fig. 2. Circular Dichroism spectra of plasmid pBR322 DNA and plasmid pBR322 DNA incubated with the $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**SCAR01**) complex for 24 h, at 37 °C at molar ratios 0.1, 0.3 and 0.5.

These changes in the wavelength and the ellipticity of free DNA indicate modifications in the secondary structure of DNA as a consequence of its interaction with the complexes. Although the substitution of ligands by N atoms of DNA bases could be responsible, the most probable hypothesis is that weak interactions occur between the ligands and DNA, through hydrogen bonds.

The comparison of the AFM images of pBR322 DNA incubated with **SCAR01** (Fig. 3a) and of the free plasmid (Fig. 3b), show typical modifications in the form of the DNA, namely super coiling, kinks and compaction. These modifications indicate that **SCAR01** interacts with DNA. Additionally, the variation of viscosity with time at 25 °C shows a decrease in the viscosity, which implies that there is no intercalation of the complex between base pairs of the DNA. All

these results are in agreement with the structure of **SCAR01** that seems not to allow neither covalent binding to DNA bases nor intercalation between bases.

It is known from the literature, that the KP1019 compound, a tumour-inhibiting drug with a new mode of action, which probably involves accumulation in transferrin receptor-(over) expressing tumour cells via transferrin receptor, subsequent reduction to Ru^{II} species, reacts with DNA and induction of apoptosis via intrinsic mitochondrial pathway [34]. Bratsos et al., presented some ruthenium complexes containing 1-(2-Picolyl)-substituted 1,2,3-triazole ligands showing their anticancer properties probably involving hydrolysis of the chloride ligand and subsequent reaction with DNA [35]. Furthermore, another recent study showed the cellular uptake and subcellular distribution including adduct formation with genomic DNA and uptake into mitochondria of two ruthenium(III)-based drugs in clinical trials, KP1019 and NAMI-A, indicating that these ruthenium drugs have distinct differences with respect to cisplatin, especially cisplatin-resistant cells. In comparison to the sensitive cells, KP1019 exhibits higher cytotoxicity and a slightly changed metabolism of the drug, whereas NAMI-A treatment results in increased intracellular ruthenium levels and a higher number of ruthenium-DNA adducts [36]. These data show that in fact the DNA can be a target for ruthenium complexes but interaction with proteins cannot be discarded as possible targets for ruthenium and other metal ions complexes.

The structures of the complexes studied in this work are quite different to the compounds containing chloride in their coordination sphere, what cause different interactions with the DNA. In this case only the complex **SCAR06** presents chloride coordinated to the ruthenium, but it was showed that only one *trans* to the phosphorus atom is dissociated from the metal [37,38].

In a previous study we reported that for the complexes $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{DMSO})(\text{H-Hypoxanthine})]$ and $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{DMSO})(\text{H}-(\text{N6-butyladenine}))]$ was possible to observe in the AFM images a strong aggregation in plasmidic DNA forms [39]. No nuclease activity was observed in any of these tested complexes and the modifications observed confirm that these complexes do not destroy the structure of the pBR322 plasmid DNA but they yield more coiled and/or more associated plasmids. As in that case, in our present work we can observe aggregation of the forms but in a lower degree; the complex does not destroy the structure of the pBR322 plasmid DNA, no nuclease activity is observed. The compacting of the forms, the supercoiled observed, are in good agreement with the modification observed in CD spectrum and viscosity

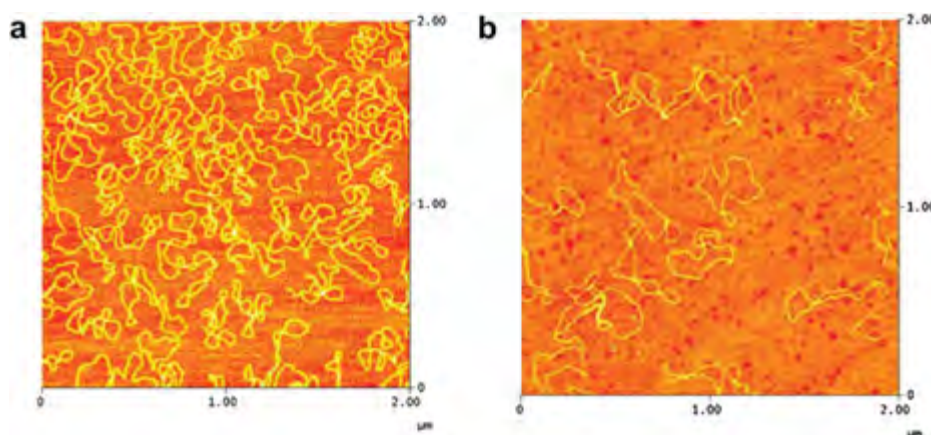


Fig. 3. (a) AFM image of the plasmid pBR322 DNA incubated with the $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**SCAR01**) complex for 24 h, at 37 °C. (b) AFM image of the free pBR322 DNA.

measurements, which indicate interaction of the compound with DNA, probably by electrostatic forces.

3. Conclusions

The synthesis and characterization of four new ruthenium complexes has been described in this work. Additionally, biological studies of these four ruthenium complexes and two other ones together with those of the free ligands were presented. The results reported here confirm the biological activity of these ruthenium complexes and raise the possibility of these compounds becoming new drugs against TB.

4. Experimental section

4.1. Materials for synthesis

Solvents were purified by standard methods. All chemicals used were of reagent grade or comparable purity. $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, the ligands 1,4-bis(diphenylphosphino)butane (dppb), 2,2'-bipyridine (bipy), 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (Me-bipy), 4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine (Cl-bipy), 1-10-phenanthroline (phen) and 2-pyridinecarboxylic acid (Hpic) were used as received from Aldrich. The complexes *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$, N-N = bipy, Me-bipy, Cl-bipy or phen were prepared according to published procedures [15,22].

4.2. Instrumentation

The infrared spectra were collected from CsI pellets in a Bomem-Michelson 102 FTIR spectrometer, in the 4000–200 cm^{-1} region. UV–visible (UV–Vis) spectra were recorded in a HP8452A (diode array) spectrophotometer. All NMR experiments were performed at 293 K in a Bruker spectrometer, 9.4 T, observing ^1H at 400.13, ^{13}C at 100.61 and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ at 161.98 MHz. The NMR spectra were recorded in CDCl_3 , with TMS (^1H and ^{13}C) and 85% H_3PO_4 ($^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$) as internal and external references, respectively. The splitting of proton, carbon and phosphorus resonances, respectively, in the reported ^1H , ^{13}C and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra, are defined as d = doublet. Mass spectra were obtained in a QuattroLC Mass Spectrometer (Micro-mass, triple-quadrupole, ESI/APCI, UK) equipped with syringe pump (Phenix 40 pump, CE Instruments, Italy). The mobile phase used to deliver the sample into the ion source by direct infusion was dichloromethane (HPLC grade, JT Baker, Mexico) with 0.1% formic acid (v/v) (JT Baker, Mexico), flowing at 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. All analyses were performed with an Electrospray Ionization (ESI) probe in the positive ion mode. In each analysis, 10 μL of a standard solution were injected at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cyclic voltammetry experiments were carried out at room temperature in CH_2Cl_2 containing 0.10 M Bu_4NClO_4 (TBAP) (Fluka Purum), with a Bio-analytical Systems Inc. BAS-100B/W electrochemical analyzer. The working and auxiliary electrodes were stationary Pt foils; a Luggin capillary probe was used and the reference electrode was Ag/AgCl. Under these conditions, ferrocene is oxidized at 0.43 V (Fc $^+$ /Fc). C, H and N contents were determined in the Microanalytical Laboratory of Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), with an EA 1108 Fisons Instruments CHNS microanalyser.

Complexes were tested for their DNA interaction ability using native calf thymus DNA (CT DNA) (Type I) by a modification of a previously reported procedure [40,41]. CT DNA (50 mg) was dissolved in water (30 mL) (overnight). Solutions of the complexes in DMSO (spectroscopy grade) (1 mL, 10^{-3} M) were incubated at 37 °C with solution of CT DNA (1 mL) during 96 h. DNA/complexes mixtures were exhaustively washed to eliminate the un-reacted complex. Quantification of bound metal was done by atomic

Table 5

Crystallographic data and refinement details for $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SCAR01).

Empirical formula	$\text{C}_{44}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}_2\text{RuPF}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Formula weight	986.80
Temperature (K)	293(2)
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	
<i>a</i> (Å)	9.8971(6)
<i>b</i> (Å)	10.4187(5)
<i>c</i> (Å)	21.9290(10)
α (°)	99.985(3)
β (°)	100.073(4)
γ (°)	95.853(3)
Volume (Å ³)	2172.12(19)
Z	2
Density (calculated) (g cm^{-3})	1.509
Absorption coefficient (mm^{-1})	0.543
F(000)	1008
Crystal size (mm^3)	0.27 × 0.25 × 0.20
θ range for data collection (°)	3.00–25.51
Limiting indices	–11 ≤ <i>h</i> ≤ 11 –12 ≤ <i>k</i> ≤ 12 –26 ≤ <i>l</i> ≤ 26
Reflections collected	11900
Independent reflections (R_{int})	7468 (0.0830)
Data/restraints/parameters	7468/0/560
Goodness-of-fit on F^2	1.004
Final <i>R</i> indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0729$, $wR_2 = 0.1739$
<i>R</i> indices (all data)	$R_1 = 0.1208$, $wR_2 = 0.2359$
Peak and hole/ $\text{e} \text{Å}^{-3}$	1.298 and –1.807

absorption spectroscopy on a Perkin Elmer 5000 spectrometer. Standards were prepared by diluting a metal standard solution for atomic absorption spectroscopy. Final DNA concentration per nucleotide was determined by UV absorption spectroscopy using molar absorption coefficient of 6000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ at 260 nm. The reported values are mean of three determinations. For the circular dichroism measurements, the SCAR01 complex was dissolved in an aqueous solution (prepared with Milli-Q water) of 4% DMSO (2 mg compound/5 mL). The stock solutions were freshly prepared before use. The samples were prepared by the addition of aliquots of these stock solutions to the appropriate volume of CT DNA in a TE buffer solution (50 mM NaCl, 10 mM tris-(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), 0.1 mM H_4edta , pH 7.4) (5 mL). The amount of complex added to the DNA solution was expressed as the input molar ratio of Ru to nucleotide, calculated by formula (1)

$$r_i = m \cdot M_{\text{nucleot}} \cdot A_m / C \cdot M_r \cdot V \quad (1)$$

where *m* = mass of the compound (g); M_{nucleot} = mean nuclear mass per nucleotide (330 g/mol); A_m = number of the metal atoms; *C* = concentration of DNA (g/mL); M_r = molar mass of the compound (g/mol); *V* = total volume of the sample (5 mL). A solution of free native DNA in TE was used as a blank. The CD spectra of DNA, in the presence and absence of complex (DNA concentration 20 mg/mL, molar ratios $r_i = 0.10, 0.30, 0.50$), were recorded at room temperature, after 24 h incubation at 37 °C, on a JASCO J-720 spectropolarimeter with a 450 W xenon lamp; a computer was used for spectral subtraction and noise reduction. Spectra for each sample were scanned twice, from 220 to 330 nm. The plotted CD spectra are the average of three independent scans. The data are expressed as average residue molecular ellipticity (θ) in degrees $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$. Viscosity experiments were carried out in an AND-SV-1 viscometer in a water bath with a water jacket, to maintain the temperature at 25 °C. A range of 200–370 μL of 5 mM solutions of the compound were added to 2 mL of 100 mM CT DNA

solution. The flow time was measured by a digital stop watch. For the Atomic Force Microscopy (TMAFM) experiment, plasmid pBR322 DNA was heated at 60 °C for 10 min to obtain the Open Circular form (OC form). Stock solution was 1 mg/mL in a buffer solution of HEPES (4 mM Hepes, pH 7.4/2 mM MgCl₂). Each sample contained 1 μL of pBR322 DNA at a concentration of 0.25 μg/μL, for a final volume of 40 μL. The amount of compound added is also expressed as r_i . AFM samples were prepared by placing a 3 μL drop of test solution onto freshly cleaved Muscovite green mica disks as the support. The drop was allowed to stand undisturbed for 3 min to favour the adsorbate–substrate interaction. Each DNA-laden disk was rinsed with Milli-Q water and blown dry with clean compressed argon gas directed normal to the disk surface. Samples were stored over silica gel prior to AFM imaging. All AFM observations were made with a Nanoscope III Multimode AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). Nano-crystal Si cantilevers of length 125 nm, with an average spring constant of 50 N/m, terminated with conical-shaped Si probe tips of apical radius 10 nm and cone angle 35° were utilized. High-resolution topographic AFM images were recorded in intermittent contact mode, at 1–3 Hz, in air at room temperature (relative humidity <40%), on various specimen areas of 2 × 2 μm.

4.3. X-ray crystallography

Orange [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆·2H₂O (**SCAR 01**) crystals were grown by slow evaporation of a dichloromethane/n-hexane solution. The crystal was mounted on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer with graphite-monochromated Mo-Kα ($\lambda = 0.71073$ Å) radiation. The final unit-cell parameters were based on all reflections. Data collections were made with the COLLECT program [42]; integration and scaling of the reflections were performed with the HKL DENZO-SCALEPACK system of programs [43]. A semi-empirical (from equivalents) absorption correction was applied [43]. The structure was solved by direct methods with SHELXS-97 [44]. The model was refined by full-matrix least squares on F^2 by means of SHELXL-97 [45]. All hydrogen atoms were stereochemically positioned and refined with a riding model. The ORTEP view of **SCAR 01** is shown in Fig. 1 and was prepared with ORTEP-3 for Windows [46]. Hydrogen atoms on the aromatic rings were refined isotropically, each with a thermal parameter 20% greater than the equivalent isotropic displacement parameter of the atom to which it is bonded. The data collections and experimental details are summarized in Table 5. The determined bond lengths and angles are not sufficiently accurate for meaningful discussion; however, useful information may still be gleaned from the diffraction study with respect to the coordination sphere of the metal.

4.4. Synthesis

The [Ru(pic)(dppb)(N-N)]PF₆ complexes (N-N = bipy, Me-bipy, Cl-bipy or phen) were prepared by allowing 50 mg (ca. 0.07 mmol) of the corresponding precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(N-N)] dissolved in 25 mL of methanol to react with excess 2-pyridinecarboxylic acid ligand (0.20 mmol; ≅ 24.6 mg) and 0.10 mmol (16.2 mg) of NH₄PF₆ under Ar atmosphere for 24 h. The final red solutions were concentrated to ca. 3 mL and water was added to precipitate an orange solid, which was filtered off, washed well with water (3 × 5 mL) and diethyl ether (3 × 5 mL) and dried *in vacuo*.

4.5. [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (**SCAR01**) yield

47 mg (75%). Anal. Calcd for C₄₄H₄₀F₆N₃O₂P₃Ru: exptl (calc) C, 55.12 (55.58); H, 4.74 (4.24); N, 4.46 (4.42). ³¹P{¹H} NMR: δ (ppm)

39.5 (d); 37.8 (d), ²J_{P-P} = 33.5 Hz. UV–Vis (CH₂Cl₂, 10⁻⁵ M): λ /nm (ϵ /M⁻¹ cm⁻¹) 259sh (2.20 × 10⁴), 290 (2.58 × 10⁴), 301sh (2.22 × 10⁴), 350sh (6.40 × 10³), 422 (3.90 × 10³), 490sh (1.60 × 10³). ESI (m/z^+): 806 [C₄₄H₄₀N₃O₂P₂Ru]⁺.

4.6. [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (**SCAR02**) yield

54 mg (70%). Anal. Calcd for C₄₆H₄₄F₆N₃O₂P₃Ru: exptl (calc) C, 56.25 (56.44); H, 4.50 (4.53); N, 4.23 (4.29). ³¹P{¹H} NMR: δ (ppm) 39.1 (d); 37.2 (d), ²J_{P-P} = 33.5 Hz. UV–Vis (CH₂Cl₂, 10⁻⁵ M): λ /nm (ϵ /M⁻¹ cm⁻¹) 260sh (1.87 × 10⁴), 288 (2.20 × 10⁴), 300sh (1.88 × 10⁴), 352sh (5.90 × 10³), 416 (3.90 × 10³), 480sh (1.30 × 10³). ESI (m/z^+): 834 [C₄₆H₄₄N₃O₂P₂Ru]⁺.

4.7. [Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF₆ (**SCAR03**) yield

61 mg (80%). Anal. Calcd for C₄₄H₃₈F₆N₃O₂P₃RuCl₂: exptl (calc) C, 51.73 (51.83); H, 4.17 (3.76); N, 4.21 (4.12). ³¹P{¹H} NMR: δ (ppm) 38.5 (d); 36.8 (d), ²J_{P-P} = 33.5 Hz. UV–Vis (CH₂Cl₂, 10⁻⁵ M): λ /nm (ϵ /M⁻¹ cm⁻¹) 259sh (2.33 × 10⁴), 294 (2.36 × 10⁴), 337sh (9.60 × 10³), 453 (4.50 × 10³), 515sh (1.70 × 10³). ESI (m/z^+): 874 [C₄₄H₃₈N₃O₂P₂RuCl₂]⁺.

4.8. [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (**SCAR04**) yield

56 mg (74%). Anal. Calcd for C₄₆H₄₀F₆N₃O₂P₃Ru: exptl (calc) C, 57.00 (56.68); H, 4.57 (4.14); N, 4.56 (4.31). ³¹P{¹H} NMR: δ (ppm) 40.2 (d); 38.0 (d), ²J_{P-P} = 33.6 Hz. UV–Vis (CH₂Cl₂, 10⁻⁵ M): λ /nm (ϵ /M⁻¹ cm⁻¹) 234 (6.99 × 10⁴), 290 (2.91 × 10⁴), 300 (2.88 × 10⁴), 408 (4.06 × 10³). ESI (m/z^+): 830 [C₄₆H₄₀N₃O₂P₂Ru]⁺.

4.9. Anti-M. tuberculosis activity assay

The anti-MTB activity of the compounds was determined by the *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) [47]. Stock solutions of the test compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in Middlebrook 7H9 broth (Difco), supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment - BBL/Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), to obtain final drug concentration ranges from 0.15 to 250 μg/mL. The serial dilutions were realized in a Precision XS Microplate Sample Processor (Biotek™). The isoniazid was dissolved in distilled water, as recommended by the manufacturer (Difco laboratories, Detroit, MI, USA), and used as a standard drug. MTB H₃₇Rv ATCC 27294 was grown for 7–10 days in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC, plus 0.05% Tween 80 to avoid clumps. Cultures were centrifuged for 15 min at 3150× *g*, washed twice, and resuspended in phosphate-buffered saline and aliquots were frozen at –80 °C. After 2 days, an aliquot was thawed to determine the viability and the Colony-Forming Unit (CFU) after freezing. MTB H₃₇Rv (ATCC 27294) was thawed and added to the test compounds, yielding a final testing volume of 200 μL with 2 × 10⁴ CFU/mL. Microplates with serial dilutions of each compound were incubated for 7 days at 37 °C, after resazurin was added to test viability. Wells that turned from blue to pink, with the development of fluorescence, indicated growth of bacterial cells, while maintenance of the blue colour indicated bacterial inhibition [25,47]. The fluorescence was read (530 nm excitation filter and 590 nm emission filter) in a SPECTRAfluor Plus (Tecan®) microfluorimeter. The MIC was defined as the lowest concentration resulting in 90% inhibition of growth of MTB [25]. As a standard test, the MIC of isoniazid was determined on each microplate. The acceptable range of isoniazid MIC is from 0.015 to 0.06 μg/mL [25,47]. Each test was set up in triplicate.

4.10. Cytotoxicity assay

In vitro cytotoxicity assays (IC_{50}) were performed on the J774A.1 (ATCC TIB-67) mouse cell line, as recommended by Pavan et al. [3]. The cells were routinely maintained in complete medium (RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) plus 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin), at 37 °C, in a humidified 5% CO_2 atmosphere. After reaching confluence, the cells were detached and counted. For the cytotoxicity assay, 1×10^5 cells/mL were seeded in 200 μ L of complete medium in 96-well plates (NUNC™). The plates were incubated at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere for 24 h, to allow cell adhesion prior to drug testing. The compounds were dissolved in DMSO (5%) and subjected to two-fold serial dilution from 1250 to 3.9 μ g/mL. Cells were exposed to the compounds at various concentrations for 24 h. Resazurin solution was then added to the cell cultures and incubated for 6 h. Cell respiration, as an indicator of cell viability, was detected by reduction of resazurin to resorufin, whose pink colour and fluorescence indicates cell viability. A persistent blue colour of resazurin is a sign of cell death [25,47]. The fluorescence measurements (530 nm excitation filter and 590 nm emission filter) were performed in a SPECTRAfluor Plus (Tecan) microfluorimeter. The IC_{50} value was defined as the highest drug concentration at which 50% of the cells are viable relative to the control [3]. Each test was set up in triplicate.

4.11. Selectivity index

The selectivity index (SI) was calculated by dividing IC_{50} for the mouse cells by the MIC for the pathogen; if the SI is ≥ 10 , the compound is then investigated further [29].

4.12. *In vitro* infection model

The intracellular anti-MTB activity of the compounds was determined by *in vitro* infection model, as suggested by Snewin et al. [48]. MTB Erdmann (ATCC 35801) containing the Luciferase Plasmid (pSMT1) [49] was cultured in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC and hygromycin (50 μ g/mL). The suspension was then seeded on Middlebrook 7H10 (solid medium), supplemented with OADC, for CFU/mL counts. The luminescence (RLU - Relative Luminescence Units) of the suspension was read in a SPECTRAfluor Plus (TECAN), after adding the substrates, namely, 0.1 ml of 1% n-decyl aldehyde (Sigma) in ethanol [50], and compared with the CFU/mL. The comparison between RLU/mL and CFU/mL was carried out three times (at 0, 3 and 7 days) (Fig. 4). The J774A.1 (ATCC TIB-67) murine macrophage-like cell line was routinely maintained in RPMI-1640 complete medium (see cytotoxicity assay), at 37 °C and 5% CO_2 . After reaching confluence, the

cells were detached and counted. For the intracellular anti-MTB activity, 5×10^5 cells/mL were seeded in a 24-well plate (NUNC™) (1 mL per well) at 37 °C and 5% CO_2 , for 24 h. The plates were incubated at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere for 24 h to allow cell adhesion prior to drug testing. Bacterial suspensions were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) by centrifuging at $2200 \times g$ for 10 min and resuspended in RPMI-1640 complete medium. Cells were infected by incubation with 1–5 bacteria per cell for 1 h at 37 °C and then washed three times with Hanks balanced salt solution (GIBCO BRL). The total number of cell-associated mycobacteria was initially determined, as follows. J774A.1 cells were lysed by the addition of 1 mL of sterile distilled water containing 0.1% Triton X-100 per well. The bacteria that were internalized in macrophages showed luminescence, confirming the infection. The complexes were diluted in RPMI-1640 complete medium at the following concentrations: MIC value, 4 times higher and 4 times lower than MIC (1 mL per well at each concentration). Our previous studies showed that incubation for 3 days is an optimal period. Thus, the plates were incubated for 3 days at 37 °C and 5% CO_2 and then washed and lysed. The RLU was determined and the percent inhibition by each compound at each concentration was calculated, based on the positive control test. As a standard test, the intracellular inhibition by rifampin was determined (Table 4). Each test was set up in triplicate.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) ref. Process: 2008/10390-2 and 2009/06499-1 and CYTED network RIIDFCM. We thank careful proofreading of the text by Timothy John C. Roberts (M.Sc).

Appendix. Supplementary Material

Crystallographic data for the structural analysis for the complex $[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF_6 \cdot 2H_2O$ (SCAR 01) discussed here have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK and is available on request quoting the deposition number CCDC 817301. These supplementary data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>.

References

- [1] Scientific Blueprint for TB Drug Development, Global Alliance for TB Drug Development (2009) pp. 26–28.
- [2] L.V. Sacks, R.E. Behrman, Developing new drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a regulatory perspective, *Tuberculosis* 88 (2008) 93–100.
- [3] F.R. Pavan, P.I.S. Maia, S.R.A. Leite, V.M. Defflon, A.A. Batista, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.Q.F. Leite, Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1898–1905.
- [4] MÉDICINS SANS FRONTIÈRES, http://www.msf.or.jp/info/pressreport/pdf/TBpipeline_E.pdf (accessed 08/05/2010).
- [5] Z. Ma, C. Lienhardt, H. Mclleron, A.J. Nunn, X. Wang, Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality, *Lancet* 5 (2010) 1–10.
- [6] D. Sriram, P. Yogeeswari, R. Thirumurugan, Antituberculous activity of some aryl semicarbazone derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4 (2004) 3923–3924.
- [7] M.B. Tarallo, C. Urquiola, A. Monge, B.P. Costa, R.R. Ribeiro, A.J. Costa-filho, R.C. Mercader, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, M.H. Torre, D. Gambino, Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 1164–1170.
- [8] I. Ott, R. Gust, Non-platinum metal complexes as anti-cancer drugs, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 340 (2007) 117–126.
- [9] F.R. Pavan, G.V. Poelhsitz, F.B. do Nascimento, S.R.A. Leite, A.A. Batista, V.M. Defflon, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.Q.F. Leite, Ruthenium(II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 598–601.
- [10] P.I.S. Maia, A. Graminha, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, A.A. Batista, D.F. Back, E.S. Lang, J. Ellena, S.S. Lemos, H.S.S. de Araújo, V.M. Defflon, Palladium(II)

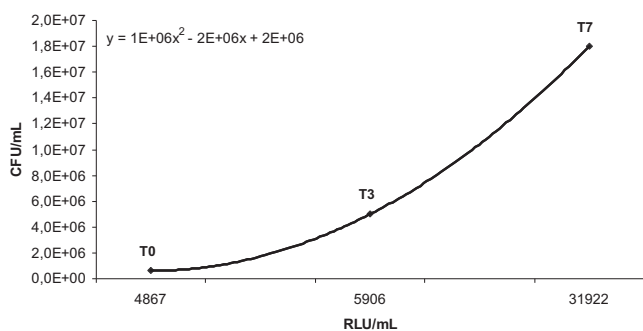


Fig. 4. Growth of MTB Erdmann (ATCC 35801) in 7 days and the comparison between CFU/mL and RLU/mL.

- complexes with thiosemicarbazones. Syntheses, characterization, cytotoxicity against breast cancer cells and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1177–1186.
- [11] P.L.S. Maia, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, S.S. Lemos, G.F. de Souza, A.A. Batista, O.R. Nascimento, J. Ellena, E.E. Castellano, E. Niquef, V.M. Deflon, Vanadium complexes with thiosemicarbazones: synthesis, characterization, crystal structures and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity, *Polyhedron* 28 (2009) 398–406.
- [12] A.C. Moro, A.E. Mauro, A.V.G. Netto, S.R. Ananias, M.B. Quilles, I.Z. Carlos, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, M. Hörner, Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of $[Pd(C2, N-dmba)(Br)(tu)]$ (dmba = N, N-dimethylbenzylamine, tu = thiourea), *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4611–4615.
- [13] M.B. Tarallo, A.J. Costa-Filho, E.D. Vieira, A. Monge, C.Q.F. Leite, F.R. Pavan, G. Borthagaray, D. Gambino, M.H. Torre, Research of new mixed-chelate copper complexes with quinoxaline N1, N4-dioxide derivatives and Alanine as ligands, potential antimycobacterial agents, *J. Argentine Chem. Soc.* 97 (2009) 80–89.
- [14] F.B. do Nascimento, G.V. Poelhsitz, F.R. Pavan, D.N. Sato, C.Q.F. Leite, H.S.S. de Araújo, J. Ellena, E.E. Castellano, V.M. Deflon, A.A. Batista, Synthesis, characterization, X-ray structure and *in vitro* antimycobacterial and antitumoral activities of Ru(II) phosphine/diimine complexes containing the SpymMe2 ligand, SpymMe2=4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1783–1789.
- [15] S.L. Queiroz, A.A. Batista, G. Oliva, M. Gambardella, R.H.A. Santos, K.S. Macfarlane, S.J. Rettig, B.R. James, The reactivity of five-coordinate Ru(II)(1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2-bipyridine, bis(oxypyridil)amine, 1, 10-phenanthroline, 7-diphenyl-1,10-phenanthroline and ethylenediamine, *Inorg. Chim. Acta* 267 (1998) 209–221.
- [16] K.S. MacFarlane, A.M. Joshi, S.J. Rettig, B.R. James, Characterization of five-coordinate ruthenium(II) phosphine complexes by X-ray diffraction and solid-state (31)PCP/MAS NMR studies and their reactivity with sulfoxides and thioesters, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 7304–7310.
- [17] P.G. Jessop, S.J. Rettig, C. Lee, B.R. James, (Hydrido)thiolato- and thiolato-carbonylphosphine complexes of ruthenium(II), *Inorg. Chem.* 30 (1991) 4617–4627.
- [18] M.P. de Araujo, E.M.A. Valle, J. Ellena, E.E. Castellano, E.N. dos Santos, A.A. Batista, mer-[RuCl₃(P–P)H₂O] (P–P = dpbb or diop) as a starting material for the synthesis of binuclear complexes. Crystallographic structures of [(dpbb)ClRu–μ(Cl)₃–RuCl(dpbb)] and [(η⁶-C₆H₆)Ru–μ(Cl)₃–RuCl(dpbb)].: imine hydrogenation using mono- and binuclear ruthenium complexes, *Polyhedron* 23 (2004) 3163–3172.
- [19] G.V. Poelhsitz, R.C. Lima, R.M. Carlos, A.G. Ferreira, A.A. Batista, A.S. de Araujo, J. Ellena, E.E. Castellano, Influence of ligands on the fac (hv)reversible arrow mer isomerization in [RuCl₃(NO)(P–P)] complexes, [P–P (Delta)= R2P(CH2)(n)PR2 (n=1–3) and R2P(CH2)POR2, PR2-CH=CH-PR2, R=Ph and (C6H11)(2)P-(CH2)(2)-P(C6H11)(2)], *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 2896–2909.
- [20] P. Sengupta, R. Dinda, S. Ghosh, W.S. Sheldrick, Synthesis and characterisation of some ruthenium(II) complexes of -N heterocyclic carboxylic acids-X-ray structures of cis-[Ru(PPh3)2(L1)2].2CH3OH and cis-[Ru(PPh3)2(L3H)2] (L1H=pyridine 2-carboxylic acid and L3H2=imidazole 4,5-dicarboxylic acid), *Polyhedron* 20 (2001) 3349–3354.
- [21] K.N. Mitra, S. Choudhury, S. Goswami, S. Peng, A family of mixed ligand complexes of Ru^{II}-L [L = N-aryl-pyridine-2-aldimine], their reactions, isolation and characterization. X-ray crystal structure of [Ru(pic)(L¹)₂][ClO₄]·CH₂Cl₂ [pic = 2-picolinate ion], *Polyhedron* 16 (1997) 1605–1614.
- [22] M.O. Santiago, C.L. Donicci Filho, I.S. Moreira, R.M. Carlos, S.L. Queiroz, A.A. Batista, Photochemical isomerization of trans- to cis-[RuCl₂(dpbb)(4,4-X2-2,2-bipy)] (X = -H, -NO₂, -Me, -COOH, -SMe, -O-SMe, -Cl, -OMe) complexes, *Polyhedron* 22 (2003) 3205–3211.
- [23] D. Sukanya, R. Prabhakaran, K. Natarajan, Ruthenium(III) complexes of dipicolinic acid with PPh₃/AsPh₃ as co-ligand: synthesis and structural characterization, *Polyhedron* 25 (2006) 2223–2228.
- [24] R.F. Winter, B.M. Brunner, T. Scheiring, High-yield syntheses and electrochemistry of cis-[RuCl₂(depe)₂] and cis-[RuCl(CH₃CN)(depe)₂]+PF₆⁻, *Inorg. Chim. Acta* 310 (2000) 21–26.
- [25] L.A. Collins, S.G. Franzblau, Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-Throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 1004–1009.
- [26] R.P. Tripathi, N. Tewari, V.K. Dwivedi, Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges, *Med. Res. Rev.* 25 (2005) 93–131.
- [27] M. Protopopova, C. Hanrahan, B. Nikonenko, R. Samala, P. Chen, J. Gearhart, L. Einck, C.A. Nacy, Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines, *J. Antimicrob. Chemother.* 56 (2005) 968–974.
- [28] K. Andries, P. Verhasselt, J. Guillemont, H.W.H. Gohlmann, J.M. Neefs, H. Winkler, J.V. Gestel, P. Timmerman, M. Zhu, E. Lee, P. Williams, D. de Chaffoy, E. Huitric, S. Hoffner, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, N. Lounis, V.A. Jarlier, Diarylquinoline drug active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Science* 307 (2005) 223–227.
- [29] I. Orme, J. Secrist, S. Anathan, C. Kwong, J. Maddry, R. Reynolds, A. Poffenberger, M. Michael, L. Miller, J. Krahenbuh, L. Adams, A. Biswas, S. Franzblau, D. Rouse, D. Winfield, J. Brooks, Search for new drugs for treatment of tuberculosis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 1943–1946.
- [30] O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P.J. Sadler, V. Brabec, DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media, *Biochemistry* 42 (2003) 11544–11554.
- [31] C. Gossens, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, DNA structural distortions induced by ruthenium-arene anticancer compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 10921–10928.
- [32] S. Das, S. Sinha, R. Britto, K. Somasundaram, A.G. Samuelson, Cytotoxicity of half sandwich ruthenium(II) complexes with strong hydrogen bond acceptor ligands and their mechanism of action cytotoxicity of half sandwich ruthenium(II) complexes with strong hydrogen bond acceptor ligands and their mechanism of action, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 93–104.
- [33] Based on ZINDO/1 calculation performed by one of us. Not published results.
- [34] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler, From bench to bedside-preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole) ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A), *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 891–904.
- [35] I. Bratsos, D. Urankar, E. Zangrando, P. Genova-Kalou, J. Kosmrli, E. Alessio, I. Turel, 1-(2-Picolyl)-substituted 1,2,3-triazole as novel chelating ligand for the preparation of ruthenium complexes with potential anticancer activity, *Dalton Trans.* 40 (2011) 5188–5189.
- [36] M. Groessl, O. Zava, P.J. Dyson, Cellular uptake and subcellular distribution of ruthenium-based metallodrugs under clinical investigation versus cisplatin, *Metallomics* 3 (2011) 591–599.
- [37] M.C.R. Monteiro, F.B. Nascimento, E.M.A. Valle, J. Ellena, E.E. Castellano, A.A. Batista, S.P. Machado, Experimental and theoretical study of the kinetics of dissociation in cis-[RuCl₂(P–P)(N–N)] type complexes, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1992–1999.
- [38] E.M.A. Valle, B.A.V. Lima, A.G. Ferreira, F.B. Nascimento, V.M. Deflon, I.C.N. Diógenes, U. Abram, J. Ellena, E.E. Castellano, A.A. Batista, Driving forces in substitution reactions of octahedral complexes: the influence of the competitive effect, *Polyhedron* 28 (2009) 3473–3478.
- [39] A. Garcia-Raso, J.J. Fiol, A. Tasada, M.J. Prieto, V. Moreno, I. Mata, E. Molins, T. Bunic, A. Golobic, I. Turel, Ruthenium complexes with purine derivatives: syntheses, structural characterization and preliminary studies with plasmidic DNA, *Inorg. Chem. Commun.* 8 (2005) 800–804.
- [40] L. Otero, M. Vieites, L. Boiani, A. Denicola, C. Rigol, L. Opazo, C. Olea-Azar, J.D. Maya, A. Morello, R.L. Krauth-Siegel, O.E. Piro, E. Castellano, M. González, D. Gambino, H. Cerecetto, Novel antityranosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redo metabolism as potential therapeutic targets, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3322–3331.
- [41] R.E. Mahnken, M.A. Billadeau, E.P. Nikonowicz, H. Morrison, Development of photo cis-platinum reagents, reaction of cis-dichlorobis(1,10-phenanthroline) rhodium(III) with calf thymus DNA, nucleotides and nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 9253–9265.
- [42] Enraf-Nonius, Collect, Nonius BV, Delft, The Netherlands, 1997–2000.
- [43] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in Oscillation mode. in: C.W. Carter Jr., R.M. Sweet (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 1997, pp. 307–326.
- [44] R.H. Blessing, An empirical correction for absorption anisotropy, *Acta. Crystallogr. Sect. A* 51 (1995) 33–38.
- [45] G.M. Sheldrick, SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution. University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [46] G.M. Sheldrick, SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis. University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [47] J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2720–2722.
- [48] V.A. Snewin, M.P. Gares, P.O. Gaora, Z. Hasan, I.N. Brown, D.B. Young, Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs, *Infect. Immun.* 67 (1999) 4586–4593.
- [49] G. Rook, B. Bloom, Mechanisms of pathogenesis in tuberculosis. in: B. Bloom (Ed.), *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. ASM Press., Washington D.C., 1994, pp. 485–501.
- [50] T.M. Arain, A.E. Resconi, D.C. Singh, K. Stover, Reporter gene technology to assess activity of antimycobacterial agents in macrophages, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 1542–1544.



Available online at
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
 www.em-consulte.com/en



Original article

Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic methods

Marcelo Miyata^{a,*}, Fernando Rogério Pavan^a, Daisy Nakamura Sato^b, Leonardo Biancolino Marino^a, Mario Hiroyuki Hirata^c, Rosilene Fressati Cardoso^d, Fernando Augusto Fiúza de Melo^e, Clelei Fernando Zanelli^a, Clarice Queico Fujimura Leite^a

^a School of Pharmaceutical Sciences, Biological Sciences Department, Paulista State University, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14800-901 Araraquara, SP, Brazil

^b Adolfo Lutz Institute, Ribeirão Preto Unit, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Department of Clinical Analyses and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

^e Clemente Ferreira Institute, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2011

Accepted 23 April 2011

Available online 12 June 2011

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis

REMA

PCR-SSCP

ABSTRACT

We determined the susceptibility profile of 80 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) clinical isolates from Brazil against isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) drugs by two phenotypic methods (Resazurin Microtiter Assay - REMA and BACTEC™ MGIT™ Mycobacterial Detection System). DNA polymorphisms were also determined by PCR-SSCP in isolates resistant to INH and RIF. BACTEC™ MGIT™ 960 detected 22 susceptible isolates to INH and RIF, 48 MDR isolates (resistant at least to INH and RIF) and nine mono-resistant isolates (eight to INH and one to RIF). REMA performance was determined by Receiver Operating Characteristic curve, whose assay was validated utilizing as reference the BACTEC™ MGIT™ 960 system. ROC curve showed cut-off values of 0.0625 µg/mL and 0.125 µg/mL, for INH and RIF, respectively. REMA-INH demonstrated sensitivity and specificity of 100% while REMA-RIF showed sensitivity of 97.2% and specificity of 100%. PCR-SSCP detected DNA polymorphisms in 87.5% and 75.5% of isolates classified as INH-resistant and RIF-resistant, respectively. One discordant sample found to RIF (resistant by BACTEC™ MGIT™ 960 and susceptible by REMA) showed no mutation by PCR-SSCP. In conclusion, our studies demonstrated that the combination of phenotypic method REMA, which allowed rapid detection of MDR-MTB with higher levels of sensitivity and specificity, with the genotypic method PCR-SSCP, which demonstrated high accuracy in the search of polymorphisms in the resistance genes, proved to be a useful strategy to study MDR-MTB clinical isolates from national reference center located in São Paulo city.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an old disease, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), affecting the human population with estimate of 9.8 million of new cases in 2011 [1]. Moreover, the emergence of multidrug-resistant strains (MDR) turned this disease into one of the biggest challenge to medicine. MDR-TB is defined as resistance at least to both drugs isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) [1]. In Brazil, the emergence of MDR strains is due to irregular, inappropriate or abandon of treatment [2]. In this context, a fast detection of MDR strains is crucial and urgent for the TB control program [3]. The identification of MDR-MTB strains by drugs susceptibility tests (DST) determination and appropriate

treatment are the most effective strategies to control the spread of MDR-TB [4].

A phenotypic DST widely utilized in developed countries is the BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System [5,6], which is used following fixed concentrations of 0.1 µg/mL and 1.0 µg/mL for INH and RMP, respectively [7]. These values represent the critical concentration separating susceptible and resistant strains. Resazurin Microtiter Assay (REMA) is another phenotypic test, which is considered to be rapid, simple and inexpensive [8]. REMA is a quantitative test based on minimal inhibitory concentration (MIC) of drug [9] and has been largely used in research [10,11] and can become an important tool for the identification of MDR-MTB strains, mainly in developing countries. However, to perform the REMA it is necessary to establish a cut-off value for each drug, which represents the critical concentration, separating susceptible and resistant strains. The correct determination of the critical concentration value is crucial to determine

* Corresponding author.

E-mail address: marcelo_miyatabr@yahoo.com.br (M. Miyata).

which treatment the patient will undergo, because if a resistant strain is classified as susceptible, the patient will suffer and the strain may propagate to health people. On the other hand, if a susceptible strain is considered resistant, the patient will be treated with more toxic and expensive drugs, burdening the health system [12].

Genotypic methods for detecting mutations in specific genes related with resistance to some drugs have been proposed [13]. An easy and fast test to be performed is the PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) [14], which consists of detecting the polymorphism generated by the mutation involved in the resistance to individual drugs by analysis of single DNA strand [15].

The goal of this study was to determine a rapid and efficient strategy through of a combination between the phenotypic method REMA and the genotypic method PCR-SSCP for INH and RIF drugs in 80 MTB clinical isolates from São Paulo city, Brazil.

2. Material and methods

2.1. Clinical isolates

INH (Sigma-Aldrich™, Steinheim, Germany) and RIF (Sigma-Aldrich™, Steinheim, Germany) drugs were tested against 80 MTB clinical isolates and MTB H₃₇Rv strain (ATCC 27294). The clinical isolates were obtained from TB patients at Clemente Ferreira Institute, a national reference center in the TB treatment, located in São Paulo city, São Paulo State, Brazil, between 2007 and 2009. The MTB strains were grown on Löwenstein-Jensen medium and the identification was confirmed by the PCR-IS6110 molecular technique [16].

2.2. Drug susceptibility testing

The phenotypic assays were performed using BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System and REMA. The BACTEC MGIT™ 960 system was performed [7] according to manufacturer. REMA was carried out [8] using standardized bacterial inoculum, 96-well plate (Nunc™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and resazurin (Sigma-Aldrich™, Steinheim, Germany) as developing agent of bacterial viability and growth. The ranges of the final drug concentration were as follows (in µg/mL): INH, 0.031–1.0; RIF, 0.062–2.0. Each test was carried out in triplicate. MIC was defined as the lowest concentration that inhibited 90% of MTB growth [8]. As a standard test, MTB H₃₇Rv (ATCC 27294) was used and isoniazid MIC was determined on each microplate test. The acceptable range of INH was from 0.015 to 0.06 µg/mL [8,17]. The tentative breakpoint concentration using the MedCalc Software (Mariakerke, Belgium) based on Receiver Operating Characteristic (ROC) curve concept was performed through comparative analysis between BACTEC™ MGIT™ 960 system data (reference) and REMA data. REMA accuracy was evaluated based on the area under the curve (AUC): 1–0.9 = excellent; 0.9–0.8 = good; 0.8–0.7 = moderate; 0.7–0.6 and 0.6–0.5 = weak = fail [18].

2.3. PCR-SSCP

Mutations screening was performed by PCR-SSCP [14]. First, DNA of clinical isolates was extracted according to the one-time thermolysis protocol [19] and purified [20]. The chosen genes for PCR-SSCP were: *inhA* (promoter region), *katG* (codon 315), *oxyR-ahpC* (intergenic region) for INH resistance [21] and RIF resistance-determining region (RRDR) of the *rpoB* gene for RIF resistance [22]. For *rpoB* gene, two pairs of primers were utilized to obtain amplified

Table 1
Primers used for PCR-SSCP.

Gene Accession number	Primer	Primer sequence (5' to 3')	Product size
<i>inhA</i> BX842576.1	inhA-1F	GCTGACTCACACCGACAAACG	190 pb
	inhA-2R	CCAGGACTGAACGGGATACGA	
<i>katG</i> X68081.1	katG-315F	AGAGCTCGTATGGCACCCGGA	150 pb
	katG-315R	CCAGCAGGGCTCTTCGTACAG	
<i>ahpC</i> BX842579.1	RC1F-ahpC	CTTCGGCCTGCTGAACCCAC	300 pb
	RC2R-ahpC	ACAGGTCACCCCGATGAGAG	
<i>rpoB</i> BX842574.1	rpoB-F1	GTCGGCGAGCTGATCCAAAAC	209 pb
	rpoB-R1	GACAGTCGGCGCTTGTGG	
	rpoB-F2	ACAAGCCCGACTGTCCG	
	rpoB-R2	GGTACGGCGTTTCGATGAACC	

products up to 300 bp according to manufacturer (Table 1). The amplified products by PCR were denatured (94 °C for eight minutes in a solution containing 95% formamide, 20 mM EDTA, 0.005% xylenocianol and 0.005% bromophenol blue), kept in ice and 5 µL of denatured products were loaded onto using polyacrylamide gel GeneGel Excel 12.5/24 (GE Healthcare) and electrophoresed in a GenePhor™ system (GE Healthcare formerly Amersham Pharmacia Biotech).

After electrophoresis, the gels were prepared with 0.5% acetic acid and 10% ethanol solutions, impregnated with 0.17% silver solution and the DNA was precipitated with 37% formaldehyde in a 3% NaOH solution. The different patterns of SSCP in comparison to the SSCP pattern of MTB H₃₇Rv (control strain) indicated the presence of mutations in the specific genes analyzed.

3. Results

BACTEC™ MGIT™ 960 system analysis detected the presence of one susceptible isolate to INH, nine susceptible isolates to RIF, 22 susceptible isolates to both drugs, 48 MDR isolates (resistant at least to INH and RIF) and nine mono-resistant isolates (eight resistant only to INH and one resistant only to RIF). MIC values determined through REMA classified the 80 MTB clinical isolates as susceptible/resistant according to susceptibility profile after obtaining cut-off value for drugs tested. We found 63 resistant isolates, AUC value of 1.0, sensitivity and specificity of 100% and a cut-off value of 0.0625 µg/mL to INH (Fig. 1) and 41 resistant isolates, AUC of 1.0, sensitivity of 97.2%, specificity of 100% and a cut-off value of 0.125 µg/mL to RIF (Fig. 2). One discordant sample was found to RIF (susceptible by REMA and resistant by BACTEC™ MGIT™ 960).

Based on a sub-classification [8], the INH-resistant phenotypically isolates were classified in 53 (84.1%) isolates of high (MIC > 1 µg/mL) and 10 (15.9%) isolates of low (MIC from 0.5 to ≤ 1 µg/mL) resistance and the RIF-resistant phenotypically isolates were classified in 30 (73.1%) isolates of high (MIC > 2 µg/mL) and 11 (26.9%) isolates of low (MIC from 0.5 to ≤ 2 µg/mL) resistance (Table 2).

PCR-SSCP patterns analysis in the INH-resistant isolates by REMA, demonstrated that among isolates classified as INH high-resistant, polymorphisms were detected in 43 (81.1%) isolates, where 10 (23.2%) isolates presented a polymorphism in the *inhA*, 28 (65.1%) isolates in the *katG*, one (2.3%) isolate in the *oxyR-ahpC* and 3 (7%) isolates in the *katG* + *oxyR-ahpC* (Table 2). In the total of isolates classified as INH low-resistant, 2 (20%) isolates showed polymorphism in the *inhA*, one (10%) isolate in the *oxyR-ahpC* and one (10%) in the *inhA* + *katG*. The same analysis in the RIF-resistant isolates by REMA, demonstrated that 18 (60%) isolates classified as RIF high-resistant presented polymorphisms and 6 (54.5%) isolates

[36]. For RIF, approximately 96% of all resistant strains have been shown to harbor mutations in the *rpoB* gene within the RRDR [14]. Therefore, the absence of polymorphisms found in the RIF-resistant isolates may be explained by the fact that only a portion of the *rpoB* gene was analyzed, with a possibility that the mutation responsible for the resistance can be located in other regions of the same gene [34]. However, mutations in the *rpoB* outside the RRDR that confer resistance have also been reported, but in a low frequency lower than 2% [37].

5. Conclusion

This study allowed demonstrating that the combination between the phenotypic method REMA, that was applied successfully in evaluating susceptibility profiles and the genotypic method PCR-SSCP, a useful molecular tool in the detection of polymorphisms, can be a rapid and efficient strategy to study MTB clinical isolates at Clemente Ferreira Institute.

Disclosure of interest

The authors have not supplied their declaration of conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP ref. Process: 2008/10390-2 and 2009/06499-1). We thank Clemente Ferreira Institute for *M. tuberculosis* clinical isolates.

References

- [1] World Health Organization. WHO Report. 2010. Global tuberculosis control, Geneva.
- [2] Jardim PCR, Zamarioli LA, Coelho AG, Figueiredo TR, Rozman MA. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas do município de São Vicente. Rev Inst Adolfo Lutz 2001;60(2):119–23.
- [3] Brasil Ministry of Health: National Fundation of Health. Tuberculosis: guideline of epidemiological surveillance/prepared by the Scientific-Technical Committee of Tuberculosis and the Committee for HIV-TB Co-infection. Brasília; 2002, 100 p.
- [4] Hazbón MH, del Socorro Orozco M, Labrada LA, Tovar R, Weigle KA, Wanger A. Evaluation of Etest for susceptibility testing of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000;38:4599–603.
- [5] Birinci A, Coban AY, Ekinci B, Durupinar B. Comparison of the proportion method with *Mycobacteria* growth indicator tube and E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97(3):351–2.
- [6] Springer B, Lucke K, Calligaris-Maibach R, Ritter C, Böttger EC. Quantitative drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation. J Clin Microbiol 2009;47(6):1773–80.
- [7] Siddiqi SH (BD Fellow, Sparks, Maryland, USA), Rüsche-Gerdes S (National Reference Center for Mycobacteria, Borstel, Germany). BACTEC™ MGIT 960™ TB System Manual; 2006.
- [8] Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(8):2720–2.
- [9] Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis: from basic science to patient care. Belgium, Brazil and Argentina; FlyingPublisher, 2007, 687 p. Available from: www.tuberculosisistextbook.com.
- [10] Pavan FR, Poehlsitz GV, do Nascimento FB, Leite SR, Batista AA, Deflon VM, et al. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. Eur J Med Chem 2010;45:598–601.
- [11] Von Groll A, Martin A, Jureen P, Hoffner S, Vandamme P, Portaels F, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(10):4498–500.
- [12] Ahmad S, Mokkaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Respir Med 2009;103(12):1777–90.
- [13] Algonafir M, Lemma E, Wolde-Meskel D, Goshu S, Santhanam A, Girmachew F, et al. Phenotypic and genotypic analysis of multidrug-resistant tuberculosis in Ethiopia. Int J Tuberc Lung Dis 2010;14(10):1259–65.
- [14] Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob Agents Chemother 1993;37(10):2054–8.
- [15] Zhang Y, Telenti A. Molecular genetics of *Mycobacteria*. In: Hatfull, Jacobs, editors. Molecular genetics of *Mycobacteria*. ASM Press; 2000. 363 p.
- [16] Clarridge 3rd JE, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol 1993;31(8):2049–56.
- [17] Collins LA, Franzblau SG. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:1004–9.
- [18] Luna-Herrera JL, Cabrera MG, Maldonado RP, Moreno JAE, Lopes JT, Pascual FO, et al. Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22(1):21–7.
- [19] Wade KA, Pounder JI, Cloud JL, Woods GL. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative Real-time PCR. J Clin Microbiol 2005;43(5):2461–73.
- [20] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons; 1989, 5300 p.
- [21] Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3373–81.
- [22] Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. Clin Microbiol Infect 2007;13(6):620–6.
- [23] Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo SP, Brasil. Divisão de Tuberculose, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Coordenadoria de Controle de Doenças. Changes in tuberculosis treatment. Rev Saude Publica 2010;44(1):197–9.
- [24] Heifets LB. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1991, 224 p.
- [25] Palomino JC, Martin A. Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit, Antwerp, Belgium. Version 03-2009; 2009, 17 p.
- [26] Jadaun GP, Agarwal C, Sharma H, Ahmed Z, Upadhyay P, Faujdar J, et al. Determination of ethambutol MICs for *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* isolates by resazurin microtitre assay. J Antimicrob Chemother 2007;60:152–5.
- [27] Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2005;55:500–5.
- [28] Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonavalona T, Martin A, Portaels F, Ramarokoto H, et al. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. Int J Tuberc Lung Dis 2007;11(6):683–8.
- [29] Abbadi SH, Sameaa GA, Morlock G, Cooksey RC. Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Infect Dis 2009;13:673–8.
- [30] Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, et al. A new multi-PCR-SSCP for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Methods 2007;70:301–5.
- [31] Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L, York DF. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *ahpC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. Tuberc Lung Dis 2000;80(1):47–56.
- [32] Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Barry 3rd CE, Stover CK. AhpC, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Biofactors 1999;10(2–3):211–7.
- [33] Sheng J, Li J, Sheng G, Yu H, Huang H, Cao H, et al. Characterization of *rpoB* mutations associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from eastern China. J Appl Microbiol 2008;105(3):904–11.
- [34] Isfahani BN, Tavakoli A, Salehi M, Tazhibi M. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Iran by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism and direct sequencing methods. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;101(6):597–602.
- [35] Negi SS, Singh U, Gupta S, Khare S, Rai A, Lal S. Characterization of *rpoB* gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis. Indian J Med Microbiol 2009;27:226–30.
- [36] Cardoso RF, Cardoso MA, Leite CQ, Sato DN, Mamizuka EM, Hirata RD, et al. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(1):59–61.
- [37] Heep M, Brandstatter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rüsche-Gerdes S, et al. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant to clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolate. Clin Microbiol 2001;39:107–10.



Original article

Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents

Fernando R. Pavan^{a,*}, Gustavo Von Poelhsitz^b, Fábio B. do Nascimento^c, Sergio R.A. Leite^d, Alzir A. Batista^{c,**}, Victor M. Deflon^e, Daisy N. Sato^f, Scott G. Franzblau^g, Clarice Q.F. Leite^{a,*}

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, CEP 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, CEP 75704-020, Catalão, GO, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

^d Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CEP 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

^e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CEP 13566-590, São Carlos, SP, Brazil

^f Instituto Adolfo Lutz, Unidade de Ribeirão Preto, CEP 14085-410, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^g Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2009

Received in revised form

11 August 2009

Accepted 29 October 2009

Available online 6 November 2009

Keywords:

Antimycobacterial agents

Mycobacterium tuberculosis

REMA

Ruthenium (II) Complexes

Phosphines

Picolinate

ABSTRACT

The synthesis, characterization and the anti-*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) activities of three ruthenium complexes containing the 2-pyridinecarboxylic acid anion (picolinate), with formulae $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (**1**), $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ (**2**) and $[\text{Ru}(\text{pic})_2(\text{PPh}_3)_2]$ (**3**) [pic = 2-pyridinecarboxylate; dppm = bis(diphenylphosphino)methane; dppe = 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane; PPh_3 = triphenylphosphine] are reported in this article. The complexes were characterized by elemental analysis, spectroscopic and electrochemical techniques. Their *in vitro* antimycobacterial activity was determined as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for MTB cell growth, measured by the REMA method. The best MICs were found for complexes (**1**) and (**2**), with values of 0.78 and 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The results are comparable to or better than “first line” or “second line” drugs commonly used in the treatment of TB.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), agent of tuberculosis, is responsible for the death of around 2–3 million people annually and a global economic toll of ~\$12 billion each year [1]. The rise of multidrug resistance (MDR) in MTB has complicated and prolonged the treatment [2]. No new drugs have been developed specifically against *mycobacteria* since the 1960s [3] and only within the last few years some promising drug candidates have emerged [4,5]. Thus, there is a great need to develop new therapeutic agents to treat tuberculosis, so as to reduce the total duration of treatment and to provide more effective treatment against MDR TB and latent tuberculosis infection [6].

There is much evidence that complexes of metals such as silver, copper and iron are effective antitubercular agents [7–10]. Very recently we reported the anti-TB activity of some thiosemicarbazones and their vanadium complexes [11]. Also from our

group some ruthenium (II) phosphine/diimine complexes with formulae $[\text{Ru}(\text{SpymMe}_2)(\text{dppb})(\text{N-N})]\text{PF}_6$, SpymMe_2 = 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine; dppb = 1,4 bis(diphenylphosphino)butane; N-N = bipy (2,2'-bipyridine) or Me-bipy (4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine), were obtained, that show promising activity against *M. tuberculosis* [12]. Interestingly, in these ruthenium complexes the free ligands (SpymMe_2 , dppb , bipy and Me-bipy) were at least 150 times less active than the complexes, suggesting a synergistic rise in activity. This contrasts with some copper (II) and nickel (II) complexes of isonicotinoyl hydrazones, in which the free organic molecules are more potent against *M. tuberculosis* than the complexes [13]. Other authors reported the evaluation of ruthenium (II) complexes, such as $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{N-N})_2(\text{L})]^{2+}$, N-N = bipy or 1,10-phenanthroline; L = picolinate (pic) or hydroxycoumarin, among others, against a series of bacteria, for example, *Vibrio cholerae* 865 and *Staphylococcus aureus*. Some of the complexes show a moderate activity, but the pic derivative fails against the six tested organisms [14]. Ranft et al., (2008) obtained a non organometallic complex derived from picolinic acid (picolinic acid N1- 6-(3-chloropyridazinyl)) amidrazone active against *M. tuberculosis*, with MIC value of 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [15]. Recently, it was demonstrated that picolinic acid also reduces intramacrophage growth of the *Mycobacterium avium* complex [16].

* Corresponding authors. Tel.: +55 (16) 33016953.

** Corresponding author. Tel.: +55 (16)33518285.

E-mail addresses: pavanfer@yahoo.com.br (F.R. Pavan), daab@ufscar.br (A.A. Batista), leitecqf@fcar.unesp.br (C.Q.F. Leite).

This paper describes the synthesis and characterization of two new ruthenium complexes containing phosphines dppm or dppe [where dppm = bis(diphenylphosphino)methane, and dppe = 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane] and the picolate anion (pic) as ligands, with formulae cis -[Ru(pic)(dppm)₂]PF₆ (**1**) and cis -[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**2**). Additionally, the *in vitro* antimycobacterial activity of those complexes, and of the complex [Ru(pic)₂(PPh₃)₂] and of the free ligands dppm, dppe, PPh₃ and Hpic (picolinic acid) against *M. tuberculosis* are presented and discussed.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of the complexes

The simple reaction of picolinic acid (Hpic) with ruthenium (II) diphosphine precursor complexes containing two chloride atoms cis -[RuCl₂(dppm)₂], cis -[RuCl₂(dppe)₂] or [RuCl₂(PPh₃)₂], resulted in the novel complexes cis -[Ru(pic)(dppm)₂]PF₆ (**1**), cis -[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**2**) and [Ru(pic)₂(PPh₃)₂] (**3**), by simple chloride exchange (see Fig. 1). The reaction conditions, with methanol as solvent, led to deprotonation of the Hpic ligand, generating the picolate anion ligand (pic).

The ³¹P{¹H} NMR spectra of (**1**) and (**2**) in CD₂Cl₂ show four separate resonance signals, corresponding to the four non-equivalent phosphorus. They consist of eight individual lines forming an overall ABMX pattern. Two signals display characteristically large *trans* couplings of 302.2 and 284.2 Hz, respectively for (**1**) and (**2**) and two much smaller coupling constants due to coupling between two inequivalent *cis*-disposed phosphorus atoms. These are assigned to the phosphorus nuclei P_a and P_c (see Fig. 1). The two remaining resonance signals are coupled by three different coupling constants ranging from 22.7 to 44.1 Hz for (**1**) and 7.1 to 29.2 Hz for (**2**), characteristic of mutually *cis*-disposed P-atoms. They are assigned to the phosphorus nuclei P_b and P_d. In the case of complex (**3**), only a singlet signal is observed at 49.1 ppm, indicating magnetically equivalent phosphorus. All ³¹P{¹H} NMR data are collected in the experimental section.

The IR spectra of the new complexes confirm the presence of the pic ligand coordinated to the metal. Three new bands present in the complexes and absent in the precursors are observed at 1666, 1337 and a weak one at 1605 cm⁻¹. These bands are attributable to the ν_{as}(C–O), ν_s(C–O) and ν(C=N) vibrations, respectively. In the free Hpic spectrum, the ν_{as}(C–O) and ν_s(C–O) bands appear in the 1700–1730 cm⁻¹ region. The presence of the PF₆⁻ counter-ion is seen in bands at 840 and 557 cm⁻¹ [17,18].

The electronic spectra of complexes (**1**) and (**2**) show two bands in the UV region, one attributed to intra-ligand transitions (π → π*) by comparing with the UV spectra of free ligands (dppm, dppe and

Hpic), and other corresponding to metal to ligand charge transfer transition (MLCT). Complex (**3**) shows an additional shoulder near to 300 nm. Table 1 contains the electronic spectra data for all the complexes [17].

Cyclic voltammetric experiments were carried out with complexes (**1–3**) in CH₂Cl₂ and the electrochemical behavior consisted of a quasi-reversible process corresponding to a one-electron redox process Ru^{III}/Ru^{II}. As expected, the E_{1/2} values for complexes (**1**) and (**2**) are considerably more anodic than for complex (**3**), since in the first two complexes there are four phosphorus atoms (good π acceptor atoms) while in complex (**3**) there are only two phosphorus atoms (Table 1).

2.2. Anti-*M. tuberculosis* activity

The *in vitro* anti-*M. tuberculosis* properties of the free ligands dppm, dppe and PPh₃, the precursors used to synthesize the complexes cis -[RuCl₂(dppm)₂] and cis -[RuCl₂(dppe)₂], and the phosphine–picolate ruthenium complexes were tested against *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 and the observed Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) are reported in Table 2.

The MICs of compounds (**1**) (0.78 μg/mL or 0.69 μM) and (**2**) (0.256 μg/mL or 0.22 μM) are comparable to or better than MICs of some “second line” drugs, such as streptomycin (MIC = 1.00 μg/mL), ciprofloxacin (MIC = 2.00 μg/mL), *p*-aminosalicylic acid (MIC = 0.5–2.0 μg/mL), ethionamide (MIC = 0.63–1.25 μg/mL), cycloserine (MIC = 12.5–50 μg/mL), gentamicin (MIC = 2.0–4.0 μg/mL), ethambutol (MIC = 0.94–1.88 μg/mL), kanamycin (MIC = 1.25–5.0 μg/mL), tobramycin (MIC = 4.0–8.0 μg/mL), clarithromycin (MIC = 8.0–16 μg/mL) and thiacetazone (MIC = 0.125–2.0 μg/mL) [19–21]. The MIC of compound (**2**) is within the range found for rifampicin (0.1–0.2 μg/mL), one of the most active drugs currently used for tuberculosis treatment. In short, both complexes are very active against *M. tuberculosis*. SQ109, a new antitubercular compound derived from ethambutol, with MIC of 1.56 μM, less active than complexes (**1**) (0.69 μM) and (**2**) (0.22 μM), has successfully completed phase 1 clinical trials and is scheduled to enter phase 2 trials in the near future [22].

The free phosphine ligand dppm exhibited MIC of 25 μg/mL, but when complexed in a structure with ruthenium (two phosphines and one pic ligand per Ru²⁺), the resulting compound (**1**) showed a 32 fold higher activity. In a gold phosphine complex, the antitumor activity was improved, compared to the free phosphine. The metal center formation in the complex acted as a carrier of the drug and protected it from oxidation or other reactions in the cell medium [23].

With a MIC of 6.5 μg/mL, the free ligand dppe was more active than dppm and, when complexed with ruthenium, gave rise to complex (**2**), which was 70 fold more active. The difference

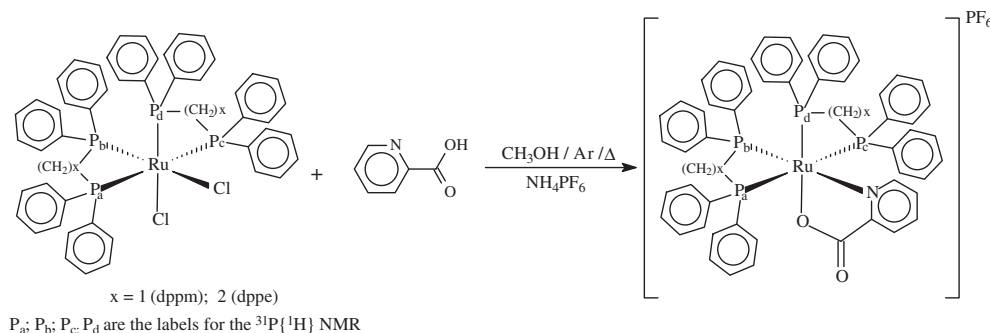


Fig. 1. Synthesis of cis -[Ru(pic)(dppm)₂]PF₆ (**1**) and cis -[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**2**) by reaction of 2-pyridinecarboxylic acid (pic) with ruthenium (II) diphosphine precursors.

Table 1
Electrochemical and electronic spectra data for complexes (1–3).

Complex	$E_{1/2}$ (V) ^a , (ΔE_p , mV) ^b	Absorption in CH ₂ Cl ₂ maxima, (nm), (ϵ /mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)
1	+1.51 (80)	250 ^{sh} (47000), 337 (5600)
2	+1.49 (90)	262 ^{sh} (30500), 318 ^{sh} (3300)
3	+0.68 (100)	260 ^{sh} (17500), 303 ^{sh} (5800), 360 (7900)

sh = shoulder.

^a Conditions: solvent, CH₂Cl₂; supporting electrolyte, TBAP (0.1 mol.L⁻¹); working electrode, platinum; reference electrode, Ag/AgCl; solute concentration, 10⁻³ mol.L⁻¹; scan rate, 100 mV.s⁻¹. $E_{1/2}$ is calculated as the average of anodic (E_{pa}) and cathodic (E_{pc}) peak potential.

^b $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$.

between the two phosphine ligands is the presence of methylene in dppm and ethylene in dppe. The substitution of ethylene for methylene changes the molecule conformation and so the distances among certain groups, which can be relevant to the interaction with a bacterium receptor. Consequently, this can result in differences on MICs values. For example, the distances between the phosphorus atoms bonded to the same methylene groups are 3.13 and 3.07 Å, and the distances for those bonded to ethylenes are 3.21 and 2.90 Å (unpublished calculations). These last ones also exhibit more flexibility around these average lengths, what would allow a better adjustment to the receptor bond sites. The same activity relation is seen in the ruthenium complexes too. In this case, another effect may be present, namely, the protection of the ligand from metabolization by the metal. The chelate nature of the complexes results in their low lability, providing safe transport of the ligand to the site of interaction with the microorganism. Since in this ligand series the tendency to chelation is greatest for $n = 2$, namely for dppe [24], the protection against metabolization is stronger in the ruthenium dppe complex. The lower activity of the precursors compounds without pic corroborates this hypothesis, since they have one less bidentate ligand and therefore higher lability.

On the other hand, compound (3) presented the poor MIC value of >50 µg/mL, while the free ligand, triphenylphosphine (PPh₃), had a MIC value of 25 µg/mL, the same as dppm. In this case, the free ligand was more active than the corresponding complex (3), indicating that the metal center formation in this complex harmed the anti-TB activity.

Another aspect to be considered concerning the activities of complexes (1–3) and the precursor *cis*-[RuCl₂(P-P)] is that the more active compounds (1) and (2) are cationic, while (3) and the precursor are neutral. Such property probably favors the uptake of the first two compounds by the bacteria, enhancing their activity against *M. tuberculosis*. Such behavior was also observed in the complex [Ru(SpymMe₂)(dppb)(N-N)]PF₆ when compared with the

Table 2
MIC values (µg/mL and µM) of anti-*M. tuberculosis* activity of Ru complexes, free ligands and reference drug.

Identification	Compound	MIC (µg/mL)	MIC (µM)
1	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppm) ₂]PF ₆	0.78	0.69
2	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	0.256	0.22
3	[Ru(pic) ₂ (PPh ₃) ₂]	>50	>57
4	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppm) ₂]	25	26.6
5	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppe) ₂]	25	25.8
Ligand	HPic	>50	>406
Ligand	dppm	25	65
Ligand	dppe	6.25	15.7
Ligand	PPh ₃	25	95
Reference drug	isoniazid	0.03	0.36

neutral precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(N-N)]. In this case the cationic complex is 6.5 times more active against *M. tuberculosis* than the neutral precursor [25].

3. Conclusions

From three synthesized ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes *cis*-[Ru(pic)(dppm)₂]PF₆ (1), *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (2) and [Ru(pic)₂(PPh₃)₂] (3), complexes (1) and (2) were qualified as potential antitubercular agents, having lower MICs than some drugs commonly used to treat TB. Further studies should be done to include the effect against drug-resistant strains and *bacilli* in a state of latency, as well as to investigate the intramacrophage activity of the new complexes.

4. Experimental

4.1. Chemicals

Solvents utilized were purified by standard methods. All chemicals used were of reagent grade or comparable purity. The RuCl₃.3H₂O and the ligands bis(diphenylphosphino)methane (dppm), 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane (dppe), triphenylphosphine and picolinic acid (HPic) were used as received from Aldrich. The precursors *cis*-[RuCl₂(P-P)] (P-P = dppm or dppe) and RuCl₂(PPh₃)₃ were prepared by published procedures [26,27].

4.2. Apparatus

The infrared spectra were recorded in the 4000–200 cm⁻¹ region, with an FTIR Bomem-Michelson 102 spectrometer, using CsI pellets. UV-visible (UV-vis) spectra were recorded in a HP8452A (diode array) spectrophotometer. All NMR experiments were performed at 293 K in a Bruker spectrometer, 9.4 Tesla, recording ¹H spectra at 400.13 MHz and ³¹P{¹H} spectra at 161.98 MHz. The NMR spectra were recorded in CD₂Cl₂, with TMS (¹H) and 85% H₃PO₄ (³¹P{¹H}) as internal and external references, respectively. The splitting of resonances signals in the reported spectra are defined as s = singlet, t = triplet, dt = double triplet, ddd = double double doublet, m = multiplet and bm = broad multiplet. Mass spectra were obtained in a QuattroLC Mass Spectrometer (Micromass, triple-quadrupole, ESI/APCI, UK), in the positive ion mode, utilizing CH₂Cl₂ as solvent. Cyclic voltammetry was carried out at room temperature in CH₂Cl₂ containing 0.10 M Bu₄NClO₄ (TBAP) (Fluka purum), with a BAS-100B/W Bioanalytical Systems Inc. electrochemical analyzer; the working and auxiliary electrodes were stationary Pt foils; a Luggin capillary probe was used and the reference electrode was Ag/AgCl. Under these conditions, ferrocene is oxidized to ferrocenium at 0.43 V (Fc⁺/Fc). The elemental analyses (CHN) were performed in the Microanalytical Laboratory of São Carlos Federal University (Brazil/SP), with an EA 1108 CHNS microanalyser (Fisons Instruments).

4.3. Synthesis

The complexes [Ru(pic)(P-P)₂]PF₆, P-P = dppm (1) and dppe (2), were prepared by reacting the corresponding precursor (0.103 mmol; ≅ 100 mg) with an excess of the picolinic acid (0.300 mmol; ≅ 36.9 mg) and 0.150 mmol (24.3 mg) of NH₄PF₆ in methanol (20 mL) under an Ar atmosphere for 24 h. The yellow final solutions were concentrated to ca. 3 mL and water was added for the precipitation of orange solids. The solids were filtered off and washed well with water (3 × 5 mL) and diethyl ether (3 × 5 mL) and dried *in vacuo*.

The [Ru(pic)₂(PPh₃)₂] (**3**) complex was synthesized by a modification of the literature procedure [17]. Excess picolinic acid (0.300 mmol; 36.9 mg) was added to a suspension of [RuCl₂(PPh₃)₃] (0.104 mmol; 100 mg) in methanol, under an atmosphere of Ar, and the mixture was refluxed for 48 h. The final solution was concentrated to ca. 5 mL and water was added to precipitate a yellow solid. The solid was filtered off and washed well with water (3 × 5 mL) and diethyl ether (3 × 5 mL) and dried *in vacuo*.

4.3.1. *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**1**)

Yield: 91 mg (78%). Anal. Calcd for C₅₆H₄₈P₅NO₂F₆Ru: exptl (calc) C, 59.38 (59.16); H, 4.15 (4.25); N, 1.10 (1.23). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.93 (1H, ddd, H₆-pic), 7.83–6.90 (40H, m, 8C₆H₅), 6.68 (1H, ddd, H₄-pic), 6.55 (1H, ddd, H₅-pic), 6.19 (1H, ddd, H₃-pic), 5.02 (1H, m, CH₂), 4.72 (2H, t, CH₂), 4.08 (1H, dt, CH₂). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CD₂Cl₂): δ(ppm) P_a = -22.2 (ddd, J_{Pa-Pc} = 302.2; J_{Pa-Pb} = 39.3; J_{Pa-Pd} = 29.1 Hz); P_c = -15.5 (ddd, J_{Pa-Pc} = 302.2; J_{Pb-Pc} = 25.6; J_{Pc-Pd} = 44.1 Hz); P_d = -7.7 (ddd, J_{Pa-Pd} = 29.1; J_{Pb-Pd} = 22.7; J_{Pc-Pd} = 44.1 Hz); P_b = 1.8 (ddd, J_{Pa-Pb} = 39.3; J_{Pb-Pc} = 25.6; J_{Pb-Pd} = 22.7 Hz). IR (cm⁻¹): 3056 (w), 1654 (s), 1602 (w), 1586 (w), 1568 (w), 1484 (m), 1435 (s), 1341 (m), 1190 (w), 1168 (w), 1098 (m), 1025 (w), 999 (m), 839 (s), 728 (m), 698 (m), 558 (m), 543 (w), 519 (m), 510 (m). ESI (m/z⁺): 1020 [C₅₈H₅₂NO₂P₄Ru]⁺.

4.3.2. *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**2**)

Yield: 96 mg (80%). Anal. Calcd for C₅₈H₅₂P₅NO₂F₆Ru: exptl (calc) C, 59.60 (59.80); H, 4.70 (4.50); N, 1.13 (1.20). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.00 (1H, ddd, H₆-pic), 7.75–6.75 (40H, m, 8C₆H₅), 6.74 (1H, ddd, H₄-pic), 6.56 (1H, ddd, H₅-pic), 6.01 (1H, ddd, H₃-pic), 3.60–1.76 (8H, b, m, CH₂). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CD₂Cl₂): δ(ppm) P_a = 45.2 (ddd, J_{Pa-Pc} = 284.2; J_{Pa-Pb} = 26.1; J_{Pa-Pd} = 14.6 Hz); P_d = 46.8 (ddd, J_{Pa-Pd} = 14.6; J_{Pb-Pd} = 18.8; J_{Pc-Pd} = 29.2 Hz); P_b = 53.1 (ddd, J_{Pa-Pb} = 26.1; J_{Pb-Pc} = 7.1; J_{Pb-Pd} = 18.8 Hz); P_c = 59.3 (ddd, J_{Pa-Pc} = 284.2; J_{Pb-Pc} = 7.1; J_{Pc-Pd} = 29.2 Hz). IR (cm⁻¹): 3057 (w), 1666 (s), 1605 (w), 1586 (w), 1570 (w), 1485 (m), 1435 (s), 1337 (m), 1193 (w), 1166 (w), 1096 (m), 1028 (w), 1000 (m), 839 (s), 744 (m), 697 (s), 557 (m), 526 (s). ESI (m/z⁺): 992 [C₅₆H₄₈NO₂P₄Ru]⁺.

4.3.3. [Ru(pic)₂(PPh₃)₂] (**3**)

Yield: 65 mg (75%). Anal. Calcd for C₄₈H₃₈P₂N₂O₄Ru: exptl (calc) C, 66.26 (66.28); H, 4.32 (4.40); N, 3.17 (3.22). ³¹P{¹H} NMR: δ(ppm) 49.1 (s). IR (cm⁻¹): 3056 (w), 1652 (s), 1601 (w), 1586 (w), 1570 (w), 1483 (m), 1433 (s), 1335 (m), 1193 (w), 1166 (w), 1093 (m), 1028 (w), 1000 (m), 839 (s), 752 (m), 697 (s), 557 (m), 523 (s). (CH₂Cl₂, 10⁻⁵ M): λ/nm (ε/M⁻¹ cm⁻¹) 260 (1.75 × 10⁴), 303 (5.80 × 10³), 360 (7.90 × 10³) UV–vis.

4.4. Anti-*M. tuberculosis* activity assay

The anti-*M. tuberculosis* activity of the compounds was determined by the REMA (*Resazurin Microtiter Assay*) method [28]. Stock solutions of the tested compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in Middlebrook 7H9 broth (Difco), supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment - BBL/Becton–Dickinson, Sparks, MD, USA), to obtain final drug concentration ranges of 0.15–50 μg/mL. The isoniazid was dissolved in distilled water as recommended by the manufacturer (Difco laboratories, Detroit, MI, USA), and used as a standard drug. *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 was grown for 7–10 days in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC and 0.05% Tween 80 to avoid clumps. Suspensions were prepared and their turbidities adjusted to match the optical density of McFarland n° 1 standard. After further dilution by 1:25 in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC, 100 μL of

the inoculum was added to each well of a 96-well microtiter plate (Nunc) together with the compounds. Samples were set up in triplicate. Cultures were incubated for 7 days at 37 °C, and 30 μL of 0.02% resazurin was added. Wells were read after 24 h for color change and measured as the fluorescence (excitation/emission of 530/590 nm filters respectively) in a SPECTRAfluor Plus (Tecan) microfluorimeter. The MIC was defined as the lowest concentration resulting in 90% inhibition of growth of *M. tuberculosis*. As a standard test, the MIC value of isoniazid was determined on each microplate. The acceptable MIC of isoniazid ranged from 0.015 to 0.05 μg/mL [29].

Acknowledgements

This study was supported by CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) ref. Process: 2008/10390-2 and 2009/06499-1 and CYTED-RIIDFCM. We thank careful proofreading of the text by Timothy John C. Roberts (M.Sc).

References

- [1] Global Alliance for TB Drug Development. www.tb Alliance.org [accessed 01.06.08].
- [2] Scientific Blueprint for TB Drug Development (2001) Global Alliance for TB Drug Development.
- [3] T.D. Primm, S.G. Franzblau, *Curr. Bioact. Compd* 6 (2007) 201–208.
- [4] C.E. Barry 3rd, R.A. Slayden, A.E. Sampson, R.E. Lee, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 221–231.
- [5] K.C. Stover, P. Warren, D.R. Vandevanter, D.R. Sherman, T.M. Arain, M.H. Langhorne, S.W. Anderson, J.A. Towell, Y. Yuan, D.N. McMurray, B.N. Kreiswirth, C.E. Barry, W.R. Baker, *Nature* 22 (2000) 962–966.
- [6] M.C.S. Lourenço, M.L. Ferreira, M.V. Souza, M.A. Peralta, T.R. Vasconcelos, M.G.O. Henriques, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1344–1347.
- [7] U. Sandbhor, D. Padhye, D. Billington, S. Rathbone, S. Franzblau, C.E. Anson, A.K. Powell, *J. Inorg. Biochem.* 90 (2002) 127–136.
- [8] A. Cuin, A. Neves, B. Szpoganicz, A.J. Bortoluzzi, C.Q.F. Leite, D.N. Sato, A.C. Massabni, M.S. Silva, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 291–296.
- [9] J.S. Oliveira, E.H.S. Sousa, L.A. Basso, M. Palaci, R. Dietze, D.S. Santos, I.S. Moreira, *Chem. Commun.* 3 (2004) 312–313.
- [10] M. Cavicchioli, C.Q.F. Leite, D.N. Sato, A.C. Massabni, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* 340 (2007) 538–542.
- [11] P.L.S. Maia, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, S.S. Lemos, G.F. Souza, A.A. Batista, O.R. Nascimento, J. Ellena, E.E. Castellano, E. Niquet, V.M. Deflon, *Polyhedron* 28 (2009) 398–406.
- [12] F.B. Nascimento, G.V. Poelhsitz, F.R. Pavan, D.N. Sato, C.Q.F. Leite, H.S.S. Araújo, J. Ellena, E.E. Castellano, V.M. Deflon, A.A. Batista, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1783–1789.
- [13] B. Bottari, R. Maccari, F. Monforte, R. Ottanà, E. Rotondo, M.G. Vigorita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 657–660.
- [14] U.P. Mazumder, M. Gupta, S. Bhattacharya, K. Somalingappa, S. Rathinasamy, S. Thangavel, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* 19 (2004) 185–192.
- [15] D. Ranft, G. Lehmark-Yvetot, K.J. Schaper, A. Buge, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* 330 (1997) 169–172.
- [16] T.F. Pais, R. Appelberg, *J. Immunol.* 164 (2000) 389–397.
- [17] P. Sengupta, R. Dinda, S. Ghosh, W.S. Sheldrick, *Polyhedron* 20 (2001) 3349–3354.
- [18] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, fifth ed. Wiley-Interscience, New York, 1997.
- [19] L.A. Collins, S.G. Franzblau, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 1004–1009.
- [20] D. Sriram, P. Yogeewari, R. Thirumurugan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 3923–3924.
- [21] R.P. Tripathi, N. Tewari, V.K. Dwivedi, *Med. Res. Rev.* 25 (2005) 93–131.
- [22] M. Protopopova, C. Hanrahan, B. Nikonenko, R. Samala, P. Chen, J. Gearhart, L. Einck, C.A. Nacy, *J. Inorg. Biochem.* 56 (2005) 968–974.
- [23] S.J. Bernesprice, R.E. Norman, P.J. Sadler, *J. Inorg. Biochem.* 31 (1987) 197–209.
- [24] R.J. Puddephatt, *Chem. Soc. Rev.* 12 (1983) 99–127.
- [25] M. Mondell, V. Bruné, G. Borthagaray, J. Ellena, O.R. Nascimento, C.Q.F. Leite, A.A. Batista, M.H. Torre, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 285–292.
- [26] M.T. Bautista, E.P. Cappellani, S.D. Drouin, R.H. Morris, C.T. Schweitzer, A. Sella, J. Zubkowski, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 4876–4887.
- [27] B.P. Sullivan, T.J. Meyer, *J. Inorg. Chem.* 21 (1982) 1037–1040.
- [28] J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaella, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2720–2722.
- [29] S.G. Franzblau, R.S. Witzig, J.C. McLaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M.T. Degnan, M.B. Cook, V.K. Quenzer, R.M. Ferguson, R.H. Gilman, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 362–366.