

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/10/2020.



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara**

MARIANA CRISTINA SOLCIA

**“Estudo do perfil biológico do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) e
possíveis mecanismos de ação frente ao *Mycobacterium tuberculosis*”**

Araraquara
São Paulo - Brasil
2018

Mariana Cristina Solcia

“Estudo do perfil biológico do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) e possíveis mecanismos de ação frente ao *Mycobacterium tuberculosis*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan.

Araraquara

São Paulo - Brasil

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Mario e Mara, que são meus maiores exemplos na vida. São eles que com sabedoria sempre ensinaram que tudo que eu for fazer, que eu faça da melhor forma possível e dê o melhor de mim!

Dedico esse trabalho também, aos que enfrentam a doença da tuberculose. Os estudos e pesquisas desenvolvidas são sinais de luta e esperança.

“E você aprende que, realmente, tudo pode suportar; que realmente é forte e que pode ir muito mais longe – mesmo após ter pensado não ser capaz. E que realmente a vida tem seu valor, e, você, o seu próprio e inquestionável valor perante a vida” (William Shakespeare).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que tornou tudo possível! Por Sua bondade e providência, por não me desamparar nos momentos difíceis e por ser minha maior fortaleza!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, que sempre dedicou tempo, paciência e disposição para tornar esse trabalho possível. Agradeço por todo conhecimento transmitido, pelos desafios propostos e por toda motivação. Foi de imenso valor ter sido sua aluna!

Aos meus colegas e amigos de laboratório que sempre me ajudaram. Aos amigos Patrícia, Débora, Júlia, Caio e Isabel pela amizade, dedicação e contribuição na realização desse trabalho. Conheci pessoas admiráveis e fiz amizades que levarei para a vida! Pessoas que tornaram o trabalho do dia-a-dia muito mais leve e prazeroso. Terei sempre muito orgulho por fazer parte de um grupo como este.

A minha família e aos meus amigos por todo apoio e por sempre acreditarem na minha capacidade! Deus me presenteou com pessoas incríveis para estarem ao meu lado.

Ao meu noivo, que sempre me motivou e compartilhou de todos os momentos e caminhos percorridos. Agradeço pela paciência e por fazer real o sentido da palavra “companheiro”.

Aos professores integrantes da banca, avaliadores da dissertação de defesa desse trabalho, Profa. Dra. Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli e Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, pela disponibilidade e aceite. O conhecimento e contribuição para esse projeto são de extrema importância.

Agradeço pela bolsa de Mestrado concedida para a realização desse trabalho: processo nº 2016/24633-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradeço o apoio financeiro recebido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Capítulo I

RESUMO

A tuberculose (TB) é considerada epidemia prevalente e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é a doença transmissível mais mortal do mundo. O surgimento de resistência às principais classes de agentes antimicrobianos, e a estimativa de que cerca de 2 bilhões de pessoas possuem o microrganismo em estado latente em todo o mundo são fatores que constituem uma séria ameaça à saúde pública e contribuem diretamente para a incidência da doença. A necessidade de desenvolver novos agentes ativos para combater a TB representa um grande desafio para o controle e tratamento da doença. Nesse trabalho, foi explorada a estratégia de reutilização do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II), $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, uma vez que possui a capacidade de perturbar o funcionamento de uma grande variedade de sistemas biológicos além de ser de fácil obtenção e baixo custo. O objetivo foi buscar novas aplicações dessa molécula, investigando seu potencial e possíveis mecanismos de ação contra o *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente causador da TB. Foi determinada a atividade de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente a cepas de *M. tuberculosis*, através do método de microdiluição em placa (REMA), onde o complexo apresentou satisfatória inibição de bacilos sensíveis em condições normais, sem perder sua atividade quando submetido a diferentes condições de meio de cultura; apresentou inibição de bactérias em estado latente pelo método de LORA e inibiu de forma ainda eficaz bactérias com perfis de resistência múltipla (MDR-TB) e extensivas (XDR-TB). Em ensaios intramacrofágicos, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi capaz de eliminar mais de 80% das micobactérias contidas no interior de macrófagos, perfil comparável ao fármaco rifampicina, de primeira linha do tratamento contra TB. O complexo exibe um excelente índice de seletividade, demonstrado em ensaios de citotoxicidade e espectro de atividade estreito, por não apresentar inibição frente a outros patógenos testados. Em ensaios utilizando plasmas de animais após aplicação de dose única oral em camundongos BALB/c, demonstrou estar biodisponível a partir de 2h após a administração. Com o intuito de investigar o possível mecanismo de ação, o ensaio com micobacteriófagos indicou uma forte relação do complexo em inibir síntese proteica bacteriana. Investigou-se também a capacidade do complexo em inibir a síntese de parede celular pela técnica de cromatografia em camada delgada e possível inibição de bombas de efluxo através do ensaio de acúmulo de brometo de etídio, vias pelas quais o complexo não demonstrou atividade. Além desses ensaios buscando desvendar o(s) alvo(s) de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, foi realizado o isolamento de bactérias resistentes ao complexo, a fim de futuramente, investigar-se um possível mutante através de sequenciamento genômico buscando o alvo de mutações presentes e relacionar com o sítio alvo do complexo em micobactérias. Determinou-se também que *M. tuberculosis* apresenta baixa frequência de mutações frente ao complexo. Com os resultados obtidos até o momento, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ se mostra bastante promissor nos estudos, por apresentar atividades em diferentes formas da doença, como estado latente e intracelularmente em macrófagos. Além disso, é ativo em bactérias resistentes aos antimicrobianos existentes no tratamento da TB, atendendo dessa forma, a declaração da OMS em priorizar pesquisa e desenvolvimento direcionados ao *M. tuberculosis*, principalmente devido aos índices de resistência.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II), reutilização de moléculas.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is considered a prevalent epidemic and according to the World Health Organization (WHO) is the deadliest transmissible disease in the world. The emergence of resistance to the major classes of antimicrobial agents and the estimation that around 2 billion people have the microorganism latent throughout the world are factors that constitute a serious threat to public health and contribute directly to the incidence of the disease. The need to develop new active agents to combat TB poses a major challenge for the control and treatment of TB. In this work, the reuse strategy of the *tris*-(1,10-phenanthroline)iron(II) complex, $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, was explored, since it has the ability to disturb the functioning of a large variety of biological systems besides being easy to obtain and low cost. The objective was to search for new applications of this molecule, investigating its potential and possible mechanisms of action against *Mycobacterium tuberculosis*, the main agent causing TB. The activity of $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ against *M. tuberculosis* strains was determined by the plaque microdilution method (REMA), where the complex showed satisfactory inhibition of sensitive bacilli under normal conditions, without losing its activity when submitted to different culture medium conditions; showed inhibition of latent bacteria by the LORA method and effectively inhibited strains with multiple resistance profiles (MDR-TB) and extensive (XDR-TB) profiles. In intramacrophagic assays, $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ was able to eliminate more than 80% of the mycobacteria contained within macrophages, a profile comparable to the drug rifampicin, the first-line treatment for TB. The complex exhibits an excellent selectivity index, demonstrated in cytotoxicity and narrow activity spectra, as it does not present inhibition against other pathogens tested. In animal plasma assays after single oral dose application in BALB/c mice, it has been shown to be bioavailable from 2h after administration. In order to investigate the possible mechanism of action, the mycobacteriophage assay indicated a strong relationship of the complex in inhibiting bacterial protein synthesis. The ability of the complex to inhibit cell wall synthesis by the thin layer chromatography technique and possible inhibition of efflux pumps was also investigated by the ethidium bromide accumulation assay, in which the complex showed no activity. In addition to these assays in order to unravel the target(s) of $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, the isolation of complex resistant bacteria was carried out in order to further investigate a possible mutant through genomic sequencing searching for the target of mutations present and relate to the target site of the complex in mycobacteria. It was also determined that *M. tuberculosis* presents a low frequency of mutations to the complex. With the results obtained, $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ shows to be very promising in the studies, since it presents activities in different forms of the disease, as latent and intracellularly in macrophages. In addition, it is active in antimicrobial resistant bacteria that exist in the treatment of TB, thus complying with the WHO declaration to prioritize research and development aimed at *M. tuberculosis*, mainly due to resistance indexes.

Key-words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *tris*-(1,10-phenanthroline)iron(II), reuse of molecules.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABM – albumina

ADC – Albumina, Dextrose e Catalase

Ag – prata

AIDS – *Acquired Immune Deficiency Syndrome*

ATP – adenosina trifosfato

Bipi – biperidina

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Cm_{max} – concentração plasmática máxima

Co – cobalto

Cu – cobre

DHR – 1,2,3-diidrorodamina

DL – Dose Letal

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – *deoxyribonucleic acid*

Doxo – doxorubicina

EDTA - Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMB – etambutol

ETA – etionamida

EtBr - brometo de etídio

Fe – ferro

Fen – fenantrolina

([Fe(fen)₃]²⁺) – complexo metálico 1-10-fenantrolina com ferro (II)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

IC – Índice de Citotoxicidade

IL – interleucina

ILT_B – Infecção Latente da Tuberculose

INH – isoniazida

IS – Índice de Seletividade
LB – meio de cultura Luria-Bertani
LORA – *Low Oxygen Recovery Assay*
mAGP – complexo micolil-arabino-galactano-peptídeoglicano
MDR-TB – bactéria resistente a múltiplos fármacos
Mn – manganês
MN – micronúcleo
MOI – *Multiplicity of Infection*
M. smegmatis – *Mycobacterium smegmatis*
M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*
MOXI – moxifloxacino
NED – N-(1-naftil) etilenodiamina
NO – *Nitric Oxide*
OADC – ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase
OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*
OMS – Organização Mundial de Saúde
Os – ósmio
PBS – tampão fosfato-salino
PEG – polietilenoglicol
PSR – Persistente Sem Replicação
PZA – pirazinamida
REMA – *Resazurin Microtiter Assay*
Rf – fator de retenção
RFP – rifampicina
Rpm – rotação por minuto
RNA – *ribonucleic acid*
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*
Ru – rutênio
SFB – Soro Fetal Bovino
STR – estreptomicina
TB – tuberculose
TB-MDR – tuberculose resistente a múltiplos fármacos
TB-XDR – tuberculose extensivamente resistente aos fármacos
TB-TDR – tuberculose totalmente resistente aos fármacos

TGF- β – *Transforming growth factor-beta*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFP – Unidade Formadora de Placa

UNESP – Universidade Estadual Paulista

URL – Unidade Relativa de Luminescência

XDR-TB – bactéria extensivamente resistente aos fármacos

Zn – zinco

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Fármacos utilizados no tratamento da TB; Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀); genes responsáveis pela resistência e mecanismos de ação desses antimicrobianos frente ao *M. tuberculosis*.....pág. 22
- Tabela 2** – Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas sensíveis de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em estado metabólico ativo (REMA) e em estado de latência (LORA).....pág. 44
- Tabela 3** – Resultados da determinação de índice de citotoxicidade (IC₅₀) do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) frente a linhagens celulares J774A.1 (ATCC TIB-67), macrófagos de murinos e MRC-5 (ATCC CCL-171), fibroblastos humanos de pulmão em diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72h); e células HepG2 (ATCC HB-8065), hepatocarcinoma humano, em 24h.....pág. 46
- Tabela 4** – Resultados da determinação do Índice de Seletividade (IS) do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) utilizando a razão (IC₅₀/CIM₉₀)pág. 47
- Tabela 5** – Resultados da atividade do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) frente diferentes cepas bacterianas Gram-positivas e negativas, cálculo da concentração inibitória de 90% (CIM₉₀). Valores apresentados como média (M) ± desvio padrão (DP) de três ensaios independentes.....pág. 50
- Tabela 6** – Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de resistências aos antimicrobianos utilizados no tratamento da TB.....pág. 51
- Tabela 7** – Resultado de Biodisponibilidade do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺), demonstrado por níveis de concentração plasmática em diferentes tempos após administração oral única (300 mg/kg/corpo) em camundongos BALB/c.....pág. 59
- Tabela 8** – Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas de *M. smegmatis* mc²155.....pág. 68
- Tabela 9** – Quantidade de UFC encontradas em concentrações iguais ou superiores ao CIM₉₉.....pág. 73
- Tabela 10** – Isolamento de *M. tuberculosis* com crescimento na concentração de 3,0 µg/mL em meio sólido 7H11.....pág. 73
- Tabela 11** – Isolamento de *M. tuberculosis* com crescimento na concentração de 2,6 µg/mL em meio sólido 7H11.....pág. 74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Taxas estimadas de incidência de TB em 2017.....pág. 14
- Figura 2** – Etapas de transmissão e patogênese da TB.....pág. 16
- Figura 3** – Estruturas químicas dos fármacos de primeira linha do tratamento da TB.....pág. 20
- Figura 4** – Estrutura química de 1,10-fenantrolina.....pág. 25
- Figura 5** – Ilustração da reação de formação do complexo de Fe^{2+} com a 1,10-fenantrolinapág. 28
- Figura 6** – Estrutura química de *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) - $([\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+})$pág. 28
- Figura 7** – Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) do complexo $([\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+})$ em diferentes condições do meio de cultura.....pág. 49
- Figura 8** – Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) do fármaco RFP em diferentes condições do meio de cultura.....pág. 49
- Figura 9** – Atividade Intramacrofágica.....pág. 53
- Figura 10** – Quantificação da produção de TGF- β em ensaios intramacrofágicos.....pág. 55
- Figura 11** – Quantificação da produção de NO em ensaios intramacrofágicos.....pág. 56
- Figura 12** – Quantificação da produção de H_2O_2 em ensaios intramacrofágicos.....pág. 57
- Figura 13** – Curva de Biodisponibilidade.....pág. 60
- Figura 14** – Procedimento de ensaio com dose inicial de 2.000 mg/Kg de peso corpóreo.....pág. 61
- Figura 15** – Taxa de sobrevivência em ensaio de toxicidade aguda.....pág. 62
- Figura 16** – Peso de órgãos de camundongos BALB/c.....pág. 63
- Figura 17** – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)pág. 64
- Figura 18** – Resultado do ensaio de acúmulo de BrEt.....pág. 66
- Figura 19** – Placa de meio de cultura sólido com Unidades Formadoras de Placas.....pág. 69
- Figura 20** – Investigação da inibição de síntese proteica micobacterianapág. 70
- Figuras 21 e 22** – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₉) de $([\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+})$ frente *M. tuberculosis* H₃₇Rv em meio sólido.....pág. 72
- Figura 23** – Célula binucleada com micronúcleo.....pág. 76
- Figura 24** – Avaliação da mutagenicidade através de ensaios de micronúcleo *in vitro*....pág. 77

SUMÁRIO

Capítulo I.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A Tuberculose.....	14
1.2 Mecanismos de transmissão e patogênese	15
1.3 Tuberculose latente	18
1.4 O tratamento da TB e o desafio da resistência aos antimicrobianos.....	19
1.5 A busca de novos fármacos anti-TB	23
1.6 Complexos Metálicos e <i>tris</i> -(1,10-fenantrolina)ferro(II).....	24
2. OBJETIVOS.....	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivo Geral.....	Erro! Indicador não definido.
2.2 Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido.
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.1 Complexo <i>tris</i> -(1,10-fenantrolina)ferro(II) e cepas bacterianas	Erro! Indicador não definido.
3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) frente ao <i>M. tuberculosis</i> em estado metabólico ativo	Erro! Indicador não definido.
3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) frente o <i>M. tuberculosis</i> em estado de latência.	Erro! Indicador não definido.
3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina e 10% de soro fetal bovino)	Erro! Indicador não definido.
3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) frente isolados clínicos com perfis de resistência aos antimicrobianos.....	Erro! Indicador não definido.
3.6 Determinação do índice de citotoxicidade (IC ₅₀) frente a linhagens celulares de macrófagos (J774A.1), fibroblastos (MRC-5) e hepatócitos (HepG2)..	Erro! Indicador não definido.
3.7 Determinação do índice de seletividade (IS)	Erro! Indicador não definido.
3.8 Determinação da atividade intramacrofágica e atividade imunomoduladora.....	Erro! Indicador não definido.
3.9 Espectro de Atividade	Erro! Indicador não definido.
3.10 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₉) frente a <i>M. tuberculosis</i> em meio sólido	Erro! Indicador não definido.
3.10.1 Isolamento e determinação da frequência das cepas resistentes de <i>M. tuberculosis</i>	Erro! Indicador não definido.
3.11 Ensaio presuntivo de mecanismo de ação relacionado à maquinaria de transcrição e tradução bacteriana	Erro! Indicador não definido.

- 3.11.1 Produção de estoque de micobacteriófagos **Erro! Indicador não definido.**
- 3.11.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente ao *M. smegmatis* **Erro! Indicador não definido.**
- 3.11.3 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de proteínas **Erro! Indicador não definido.**
- 3.12 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de parede celular **Erro! Indicador não definido.**
- 3.13 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a inibição de bomba de efluxo **Erro! Indicador não definido.**
- 3.14 Avaliação do potencial mutagênico utilizando a técnica de micronúcleo *in vitro* . **Erro! Indicador não definido.**
- 3.15 Avaliação da biodisponibilidade oral..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.16 Determinação da toxicidade aguda **Erro! Indicador não definido.**
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **Erro! Indicador não definido.**
- 4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente ao *Mycobacterium tuberculosis* em estado metabólico ativo e não-replicante **Erro! Indicador não definido.**
- 4.2 Determinação do Índice de Citotoxicidade frente a linhagens celulares HepG2, J774A.1 e MRC-5 **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3 Determinação do Índice de Seletividade (IS) **Erro! Indicador não definido.**
- 4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente ao *Mycobacterium tuberculosis* em estado metabólico ativo submetido a diferentes condições **Erro! Indicador não definido.**
- 4.5 Avaliação do espectro de atividade **Erro! Indicador não definido.**
- 4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente isolados clínicos de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de resistência **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7 Determinação da atividade intramacrofágica e imunomoduladora . **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.1 Atividade intramacrofágica **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.2 Atividade imunomoduladora..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.9 Avaliação da toxicidade aguda **Erro! Indicador não definido.**
- 4.10 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de parede celular **Erro! Indicador não definido.**
- 4.11 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a inibição de bomba de efluxo **Erro! Indicador não definido.**
- 4.12 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de proteínas .. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.13 Seleção e isolamento das cepas resistentes de *M. tuberculosis* **Erro! Indicador não definido.**
- 4.14 Avaliação do potencial mutagênico **Erro! Indicador não definido.**

5. CONCLUSÃO.....	30
6. REFERÊNCIAS	31
Capítulo II.....	Erro! Indicador não definido.

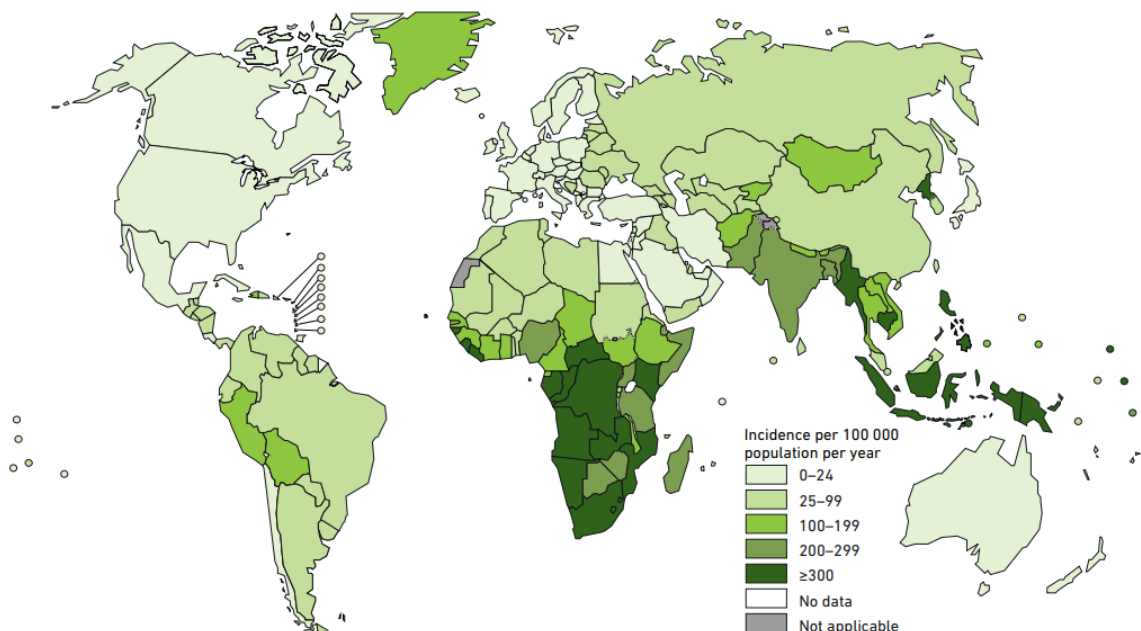
1. INTRODUÇÃO

1.1 A Tuberculose

A tuberculose (TB) existe há milênios e continua a ser um grande problema de saúde global, deixando milhões de pessoas doentes a cada ano. A doença ocupa um lugar entre as dez principais causas de morte em todo o mundo. Nos últimos 5 anos, tem sido a principal causa de morte por um único agente infeccioso, acima da AIDS/ HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Apesar de mais de duas décadas de esforços para encontrar e tratar fontes infecciosas da doença, cerca de 10,0 milhões de casos de TB incidentes com 1,3 milhões de óbitos ocorreram em 2017 no mundo todo (Figura 1). Portanto, mundialmente, o “fim” da TB como uma epidemia e problemática na saúde pública ainda continua sendo uma aspiração e não uma realidade (LEUNG; CHEE; ZHANG, 2017; WHO, 2018).

Figura 1 – Taxas estimadas de incidência de TB em 2017



Fonte: WHO (2018).

O principal patógeno causador da TB é o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), descrito pela primeira vez por Robert Koch em 1882. Nessa época, nos Estados Unidos e na

Europa, a TB matou uma em cada sete pessoas. Depois de um século da descoberta do Dr. Koch, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a União Internacional declararam o primeiro dia Mundial da TB em 24 de março 1982 (VASAVA et al., 2017; GORDON; PARISH, 2018).

M. tuberculosis é um bacilo aeróbico, tendo como característica definidora uma taxa de crescimento lento, com um tempo de divisão de cerca de 24 horas. É visualizado por microscopia óptica através da coloração de *Ziehl-Neelsen*, por meio da qual sua parede celular espessa e cerosa retém a coloração de carbolfucsina frente a lavagens ácido-álcool. Essa parede é característica das micobactérias, embora fossem classificadas como Gram-positivas, possuem uma estrutura semelhante a das bactérias Gram-negativas com uma segunda "membrana externa" que contém os ácidos micólicos - ácidos graxos ramificados de cadeia longa. A camada externa da membrana citoplasmática forma um complexo maior, com o núcleo compreendendo peptidoglicano ligado ao arabinogalactano, por sua vez ligado aos ácidos micólicos, conhecido como complexo micolil-arabino-galactano-peptídeo-glucano (mAGP). *M. tuberculosis* é um agente patogênico intracelular, capaz de parasitar fagócitos mononucleares humanos, passando a maior parte do seu ciclo de vida em macrófagos (VASAVA et al., 2017; GORDON; PARISH, 2018).

1.2 Mecanismos de transmissão e patogênese

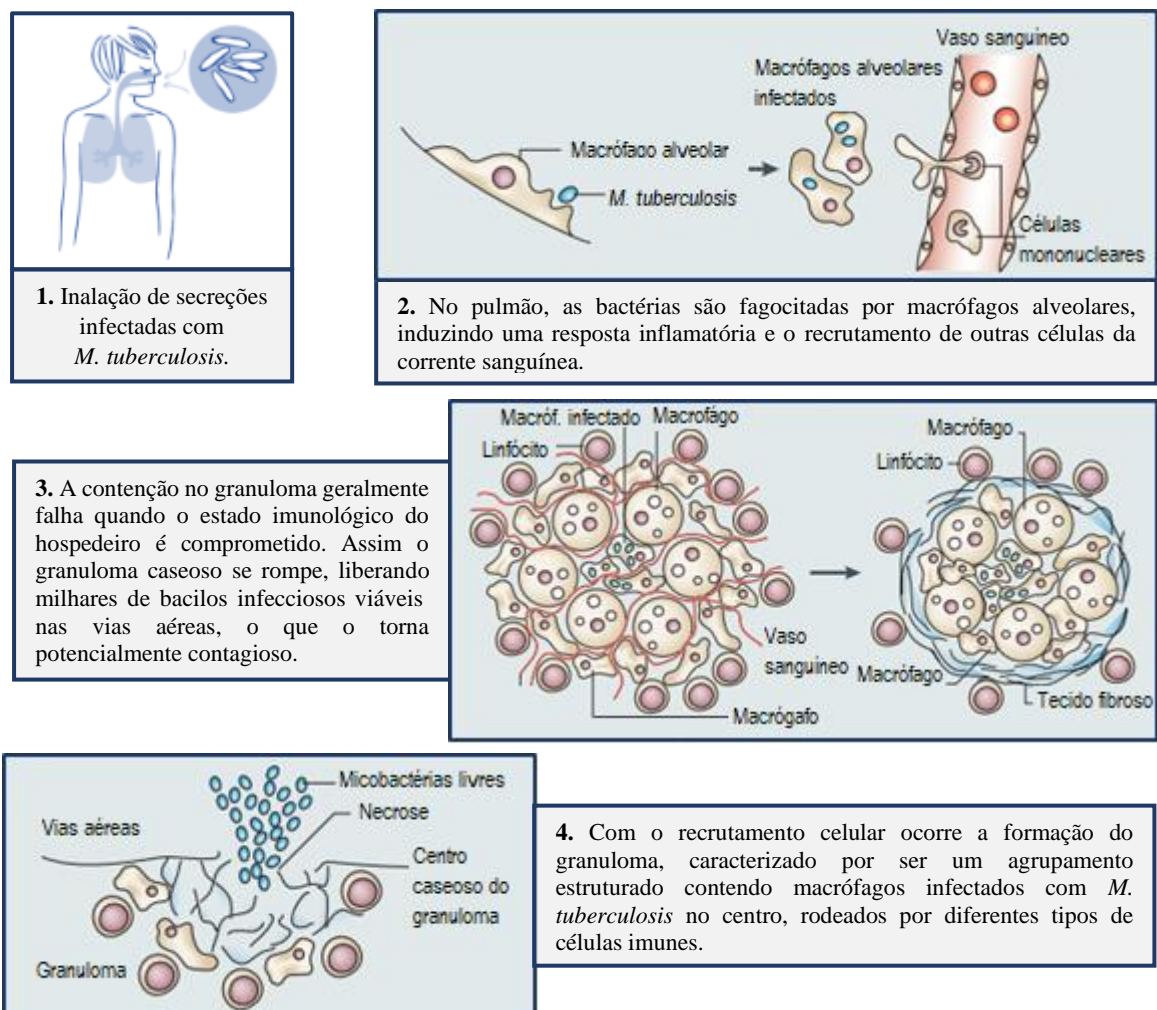
A TB afeta os pulmões em mais de 80% dos casos (TB pulmonar), mas também pode afetar outros locais (TB extrapulmonar) se espalhando através da extensão linfática, hematogênica ou direta de um foco infeccioso (ANKRAH et al., 2017). A doença é transmitida quando pessoas que estão doentes com TB pulmonar ativa expulsam secreções infectadas com *M. tuberculosis* das vias respiratórias, por exemplo, tossindo, e então o bacilo é inalado por hospedeiros susceptíveis (WHO, 2016; CHIN et al., 2017). A figura 2, a seguir, demonstra esquematicamente de forma resumida e simplificada, as etapas de transmissão e patogênese da TB. Como em muitas outras doenças infecciosas, a transmissão da TB não é uniforme, e a resposta à infecção difere para cada indivíduo. Em particular, pessoas com uma forma da TB chamada tuberculose cavitária são especialmente infecciosas, pois é a consequência da destruição do tecido pulmonar com formação de espaços abertos macroscópicos que contém numerosos bacilos e conecta-se com as grandes vias aéreas, o que facilita a expectoração eficiente da bactéria (YOUNGA; VERRECK, 2012).

Após a inalação de bactérias, o microrganismo pode ser completamente eliminado pelo

sistema imunológico, pode ser contido em estado quiescente, ou dar origem a uma infecção ativa. O resultado depende do estado imunológico do hospedeiro e pode ocasionar um espectro de estados de TB sem infecção, latente através da doença subclínica e a doença ativa declarada (ANKRAH et al., 2017).

Em pacientes sem exposição prévia ao *M. tuberculosis*, os receptores de reconhecimento de padrões expressos por macrófagos, células dendríticas e células epiteliais alveolares interagem com ligantes presentes nas micobactérias. Isso resulta na produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas induzindo uma resposta inflamatória local e a migração de monócitos da corrente sanguínea para o local de infecção (RUSSELL, 2007; ANKRAH et al., 2017).

Figura 2 - Etapas de transmissão e patogênese da TB



Fonte: Ilustração adaptada de RUSSEL (2006).

O objetivo da imunidade celular inata é a destruição do agente patogênico através da formação do fagossoma, ou seja, em organelas celulares em que ocorre a degradação enzimática do material fagocitado. O processo necessário de maturação fagossômica requer fusão com o lisossoma, acidificação do fagossoma por bombeamento de prótons e ativação de hidrolases lisossômicas. *M. tuberculosis* pode bloquear este processo e, assim, escapar de forma eficaz, de um ataque pela imunidade inata (WELIN et al., 2011; HERZMANN et al., 2017). *M. tuberculosis* tem a capacidade notável de sobreviver dentro do ambiente hostil do macrófago (PIETERS, 2008). Os bacilos intracelulares, geralmente, são mais difíceis para tratar devido ao acesso limitado de determinados fármacos às células macrofágicas, necessitando de tratamento crônico com altas doses terapêuticas para controle efetivo e tratamento da doença (SCHWARTZ et al., 2006).

A resposta imune adaptativa geralmente ocorre após aproximadamente 4-6 semanas em humanos, após a apresentação de antígenos de *M. tuberculosis* por células dendríticas a linfócitos T nos linfonodos, promovendo a migração dessas células para o local da infecção, induzindo a formação de um granuloma. Os granulomas são agrupamentos estruturados contendo macrófagos infectados com *M. tuberculosis* no centro, rodeados por diferentes tipos de células imunes, em particular macrófagos e linfócitos T (PIETERS, 2008; ANKRAH et al., 2017). A formação desse granuloma é um mecanismo do sistema imune adaptativo em oferecer proteção ao hospedeiro contra a infecção, dificultando que os bacilos de *M. tuberculosis* se espalhem para outros tecidos (ANKRAH et al., 2017).

Em um único paciente, as estruturas de granuloma são heterogêneas e podem ser celulares e bem vascularizadas, necróticas com bactérias extracelulares residindo em um núcleo de *caseum* rico em lipídios ou então do tipo cavitário, no qual o granuloma se funde com uma via aérea. Em muitos casos, a estrutura do granuloma restringe o fluxo sanguíneo e a difusão de fármacos em seu centro (WELLINGTON; HUNG, 2018). Os granulomas transmissivos possuem abundantes neutrófilos e a necrose predomina e permite reativação, crescimento e disseminação de *M. tuberculosis* para outras partes do corpo (ANKRAH et al., 2017).

Os vários nichos que o *M. tuberculosis* ocupa, incluindo o interior dos macrófagos e no *caseum* dos granulomas, são caracterizados por hipóxia, privação de nutrientes, nitrogênio reativo, espécies de oxigênio e pH ácido (WELLINGTON; HUNG, 2018).

Os granulomas podem persistir durante anos e conter eficientemente o patógeno enquanto o indivíduo se mantiver imunocompetente. Geralmente, 90% dos indivíduos que entram em contato com os bacilos de *M. tuberculosis* controlam a infecção, de forma

assintomática, contendo essas bactérias num estado dormente no interior do granuloma, conhecido como infecção latente da tuberculose (ILTB). Nos casos de ILTB, a estrutura do granuloma provavelmente representa um equilíbrio entre um patógeno potencialmente perigoso e o sistema imune do hospedeiro. A delicadeza deste equilíbrio é ilustrada pela observação de que qualquer deterioração da imunidade do hospedeiro resulta em uma condição potencialmente fatal de um indivíduo que possui *M. tuberculosis* em latência (BARTLETT, 2007; PIETERS, 2008). Enquanto a imunidade do hospedeiro (na forma de macrófagos ativados e células T funcionais) é efetiva, geralmente não há efeito adverso do *M. tuberculosis* na saúde do hospedeiro (SAUNDERS; BRITTON, 2007).

1.3 Tuberculose latente

Cerca de 90% dos pacientes infectados podem normalmente responder à infecção por *M. tuberculosis* por formação de granulomas e estabelecimento de TB latente, durante a qual os bacilos de *M. tuberculosis* persistem no hospedeiro em um estado de hipóxia, metabolicamente inativos ou de reprodução lenta (GORDON; PARISH, 2018).

É estimado que cerca de 23% da população mundial, aproximadamente 1,7 bilhões de indivíduos apresentem essa forma de infecção ILTB, na qual abrigam bacilos não infecciosos, definida pela OMS como estado de resposta imune persistente à estimulação por antígenos de *M. tuberculosis* sem evidência de TB ativa clinicamente manifestada (ANKRAH et al., 2017; WHO, 2018).

Para a maioria dos casos ILTB, o *M. tuberculosis* permanece latente por muitos anos ou até durante toda a vida do hospedeiro (TANG; JOHNSTON, 2017). No entanto, se o sistema imune hospedeiro não puder conter as micobactérias, o microrganismo terá a oportunidade de progredir para uma infecção ativa e sintomática. Aproximadamente 5-15% dos indivíduos com TB latente desenvolverão a doença ativa, principalmente quando expostos a perturbações imunes profundas, como durante um tratamento com fármacos imunossupressores, em doenças como o diabetes associado a deficiência imune e especialmente indivíduos coinfectados com HIV, sendo essa associação uma das principais causas de morte em indivíduos doentes (LEÓN-DÍAZ et al., 2010; TANG; JOHNSTON, 2017; TOUSIF et al., 2017).

Em 2015, cerca de 35% dos pacientes infectados pelo HIV morreram devido a coinfeção com TB. Os indivíduos soropositivos para o HIV e infectados pelo *M. tuberculosis* apresentam de 21 a 34 vezes mais chance de desenvolver a doença ativa comparados aos

soronegativos para o HIV. Esses indivíduos imunocomprometidos desenvolvem TB ativa devido à falha de seu sistema imunológico em controlar ou erradicar a infecção (CAILLEAUX-CEZAR, 2012; WALKER, 2013; WHO, 2016).

Quando ocorre a reativação da doença, ou seja, bacilos em estado latente se tornam infecciosos, o granuloma perde a sua estrutura deixando de conter as bactérias viáveis, o que conduz à sua replicação e à disseminação da doença. Nestes casos, o sistema imune é incapaz de conter a infecção, o centro caseoso liquidifica, levando à formação de uma cavidade (RUSSELL, 2007). Os macrófagos não sobrevivem nestas lesões, sendo ineficazes no controle da multiplicação das bactérias, agora também com uma localização extracelular. Nesta fase, o bacilo pode atingir números muito elevados, sendo bem conhecido o elevado risco de contágio na TB pulmonar cavitária (MIRANDA et al., 2012). Este processo pode resultar na libertação de bactérias viáveis para a corrente sanguínea, originando focos de infecção à distância em vários órgãos, ou as bactérias podem ser libertadas para as vias aéreas onde podem ser expulsas dos pulmões e infectar outros indivíduos. Portanto, a transmissão de TB para a comunidade ocorre no ciclo repetitivo interminável de contato, infecção e desenvolvimento de doença ativa (KIM; KIM, 2018).

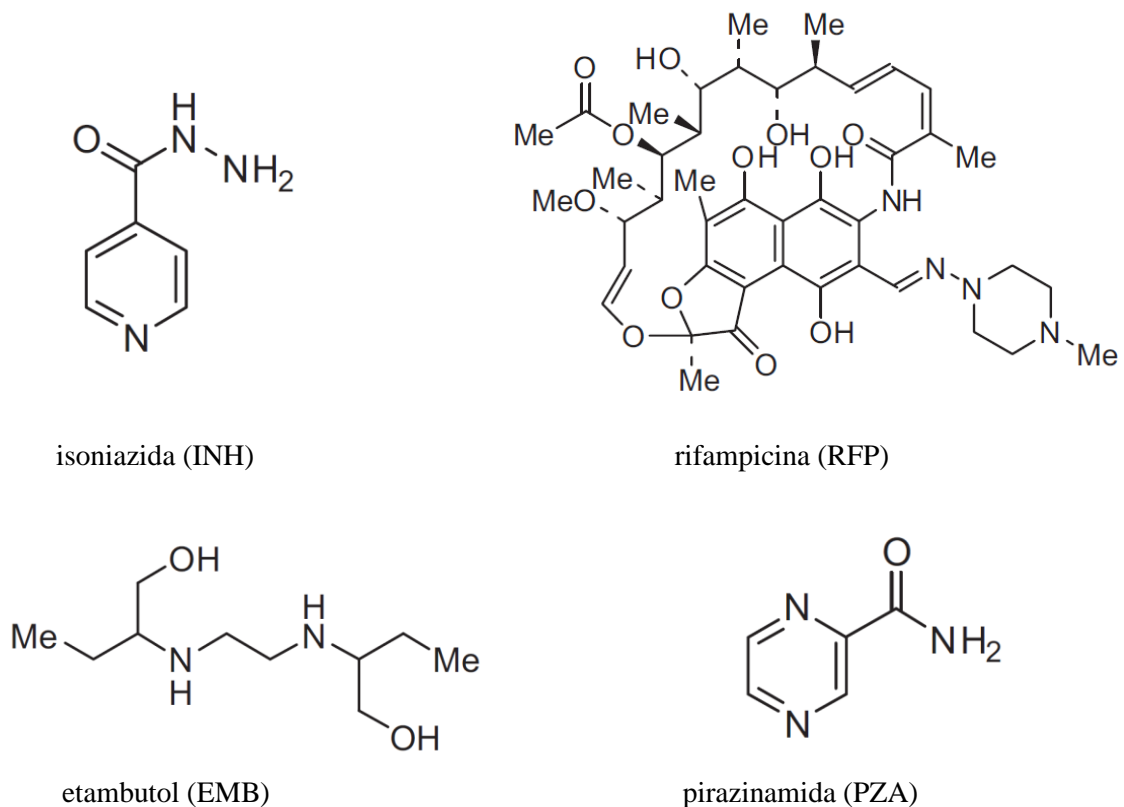
Embora a maior parte dos indivíduos infectados por ILTB permaneçam assintomáticos, eles servem como o reservatório global para o agente patogênico, tornando o controle desta doença um desafio ainda mais significativo (RUSSELL, 2007; TOUSIF et al., 2017). Existe a hipótese também, que *in vivo*, as subpopulações de bacilos não replicantes contribuem para o longo tempo necessário para tratamento da TB, o qual pode contribuir para o surgimento de bactérias resistentes a medicamentos (WELLINGTON; HUNG, 2018). Portanto, se a quimioprofilaxia efetiva é dada a indivíduos com ILTB, o risco de desenvolver TB ativa é significativamente reduzido, podendo contribuir também na redução de tempo de tratamento e seleção de bactérias resistentes (TANG; JOHNSTON, 2017).

1.4 O tratamento da TB e o desafio da resistência aos antimicrobianos

O tratamento com fármacos efetivos contra a TB foi desenvolvido pela primeira vez na década de 1940, com a descoberta da estreptomicina em 1943. O advento dos antibióticos para o tratamento da TB representou um grande avanço na luta contra a doença (MATTELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014; WHO, 2016).

Atualmente, o tratamento recomendado para novos casos de TB susceptível aos fármacos é um regime de 6 meses, utilizando quatro medicamentos de primeira linha: isoniazida (INH), rifampicina (RFP), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), cujas estruturas químicas são apresentadas na figura 3 (CHAUDHARI et al., 2016; WHO, 2016). Uma combinação de antibióticos é recomendada para evitar a seleção de mutantes resistentes. No entanto, apesar do estabelecimento precoce de terapias de combinação de fármacos no tratamento da doença, as cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos continuaram a evoluir (CITRON; ANGEL; CAMPBELL, 1976; GYGLI et al., 2017; MAITRE et al., 2017).

Figura 3 – Estruturas químicas dos quatro fármacos de primeira linha do tratamento da TB



Fonte: BRENNAN et al. (2008).

No tratamento de TB resistente a medicamentos, os pacientes são submetidos a terapias com antimicrobianos por 9 meses a dois anos ou mais, durante o qual são administrados mais de 10 mil comprimidos, além de injeções diárias, por pelo menos 6 meses. Além disso, os regimes de tratamento nos casos de resistência são menos efetivos e menos acessíveis do que os regimes de primeira linha, mais onerosos, tóxicos e complicados de serem entregues (ZIGNOL et al., 2016). Daqueles que são capazes de acessar o tratamento, apenas 55% dos

pacientes com TB multirresistente (MDR-TB) e 34% dos pacientes com TB extensivamente resistente aos fármacos (XDR-TB) são curados (WHO, 2018; WELLINGTON; HUNG, 2018).

A tuberculose resistente a múltiplos fármacos (TB-MDR) é definida como uma forma da doença causada por bactérias que são resistentes ao tratamento com pelo menos dois dos medicamentos anti-TB de primeira linha mais poderosos, a isoniazida e rifampicina. (WHO, 2014; CHAUDHARI et al., 2016). A tuberculose extensivamente resistente aos fármacos (TB-XDR) é definida como TB causada por uma bactéria resistente a múltiplos fármacos (MDR), ou seja, resistente a pelo menos rifampicina e isoniazida, que também é resistente a qualquer fluoroquinolona e qualquer um dos medicamentos injetáveis de segunda linha, como capreomicina, canamicina ou amicacina. O termo "totalmente resistente aos fármacos" (TB-TDR) foi proposto para definir casos de tuberculose com resistência além da TB-XDR, na qual as micobactérias são praticamente resistentes a todos os medicamentos disponíveis de primeira e segunda linha do tratamento (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014).

A administração inadequada dos fármacos durante o tratamento pode resultar em resistência a medicamentos, falha no tratamento ou até mesmo morte. Devido ao longo período de tratamento, quando os pacientes estão assintomáticos, geralmente abandonam a terapia, pois não sentem a necessidade de continuarem submetidos ao tratamento. A hepatotoxicidade prolongada, causada pela associação dos antibióticos, é outro fator que contribui para a cessação do tratamento pelos pacientes. Essa interrupção, impede a depuração total dos bacilos de *M. tuberculosis* do organismo dos pacientes, representando substanciais riscos para a geração de organismos micobacterianos resistentes (CHAUDHARI et al., 2016; TOUSIF et al., 2017).

Em todo o mundo, a incidência da TB está caindo em cerca de 2% ao ano, porém, a doença ainda permanece como uma das 10 maiores causas de morte em todo o mundo. Os altos índices da doença estão relacionados principalmente com o desenvolvimento da resistência das bactérias aos medicamentos, que aumentam profundamente os desafios para erradicar a TB mundial (WHO, 2016; ABDELRAHMAN et al., 2017).

Essa crescente incidência de resistência a medicamentos gera cada vez mais preocupações com o tratamento da doença, constituindo uma séria ameaça à saúde pública. Segundo dados publicados pela OMS, em 2016 existiram 580.000 novos casos de TB-MDR. Destes, cerca de 250.000 (160.000 a 340.000) pacientes morreram, tornando a TB-MDR a doença mais comum e mortal causada pela resistência antimicrobiana em todo o mundo (WHO, 2016, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Muitos casos de TB-XDR são considerados praticamente intratáveis, dependendo do nível de resistência aos medicamentos de segunda linha, além disso, as condições inerentes à imunidade do paciente podem contribuir para as altas taxas de morbidade e mortalidade associadas com a resistência (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014; ABDELRAHMAN et al., 2017).

Os resultados do tratamento para pacientes com TB múltipla e extensivamente resistente a medicamentos (TB-MDR/ XDR) permaneceram estáticos por muitos anos, apesar das melhorias na cobertura do tratamento e disponibilidade de mais eficazes (fluoroquinolonas de geração posterior) ou novos medicamentos (bedaquilinos e delamanídeos) (WHO, 2017).

Há duas maneiras pelas quais os indivíduos contraem TB resistente a fármacos. A resistência primária resulta da infecção por uma cepa resistente ao fármaco, enquanto a resistência que se desenvolve durante a terapia é referida como resistência secundária ou adquirida (DHEDA et al., 2017).

O principal veículo que conduz a resistência a fármacos em *M. tuberculosis* é a aquisição de mutações em genes específicos que codificam os alvos dos fármacos ou enzimas ativadoras de fármacos. Outros fatores atribuídos à resistência do bacilo é a característica de sua parede celular em ser altamente hidrofóbica, podendo dificultar a atividade de alguns fármacos, e ainda, a ação de bombas de efluxo, que fornecem um meio para o microrganismo escapar das terapias antimicrobianas (GREEN; GARNEAU-TSODIKOVA, 2013; DOOKIE et al., 2018).

Os avanços na tecnologia de sequenciamento do genoma de *M. tuberculosis* aumentaram significativamente a compreensão dos mecanismos de resistência a medicamentos antituberculosos, além de direcionar os mecanismos pelos quais o fármaco atua na eliminação do bacilo (DOOKIE et al., 2018). A tabela 1 ilustra mecanismos de resistência frente a alguns antimicrobianos utilizados na terapia da TB.

Tabela 1 - Fármacos utilizados no tratamento da TB; intervalo considerável de Concentração Inibitória Mínima (CIM); genes responsáveis pela resistência e mecanismos de ação desses antimicrobianos frente ao *M. tuberculosis*.

Antimicrobiano	CIM (mg/L)	Gene	Função do produto do gene	Função	Mecanismo de ação
rifampicina	0.05-0.1	<i>rpoB</i>	Subunidade β da RNA polimerase	Fármaco alvo	Inibição da síntese de RNA

Antimicrobiano	CIM (mg/L)	Gene	Produto do gene	Função	Mecanismo de ação
isoniazida	0.02-0.2	<i>KatG</i>	catalase/peroxidase	Conversão de pró-fármaco	Inibição da biossíntese de ácidos micólicos e múltiplos efeitos
		<i>inhA</i>	Enoil redutase	Fármaco alvo	
		<i>ahpC</i>	Alquilo hidroperóxido redutase	Fármaco alvo	
pirazinamida	16-50 (pH 5.5)	<i>pncA</i>	PZase	Conversão de pró-fármaco	Alteração do potencial de membrana
		<i>RpsA</i> *	Proteína ribossomal S1	Fármaco alvo	Inibição da síntese proteica
estreptomicina	2-8	<i>rpsL</i>	Proteína ribossomal S12	Fármaco alvo	Inibição da síntese proteica
		<i>rrs</i>	16S rRNA	Fármaco alvo	
		<i>gidB</i>	7-metilguanossina methyltransferase	Fármaco alvo	
etambutol	1-5	<i>embB</i>	Arabinosil transferase	Fármaco alvo	Inibição da síntese de arabinoglicano
fluoroquinolonas	0.5-2.0	<i>gyrA/gyrB</i>	DNA girase	Fármaco alvo	Inibição da DNA girase
canamicina/ amicacina	2-4	<i>rrs</i>	16S rRNA	Fármaco alvo	Inibição da síntese proteica
capreomicina/ viomicina	2-4	<i>tlyA</i>	Rna methyltransferase	Fármaco alvo	Alteração da síntese proteica
ethionamida	10	<i>inhA</i>	Enoil redutase	Fármaco alvo	Inibição da síntese de ácidos micólicos
bedaquilina	0.03	<i>atpE</i>	ATP sintase	Produção de ATP	Inibição da unidade C da ATP sintase

Fonte: DA SILVA; PALOMINO (2011).

1.5 A busca de novos fármacos anti-TB

Diante do atual cenário representado pela TB como a doença infecciosa que mais mata pessoas anualmente, a OMS divulgou um relatório em 2017 destacando o *M. tuberculosis* como um patógeno prioritário para a pesquisa e desenvolvimento contínuo de novos antibióticos (HOUBEN; DODD, 2016; WHO, 2017).

Os quatro principais fármacos existentes eficazes para a TB (INH, RFP, PZA e EMB) foram introduzidos há mais 50 anos (VASAVA et al., 2017). Existe, portanto, uma necessidade urgente de desenvolver agentes anti-tuberculosos mais novos, potentes e seguros que possuam um novo mecanismo de ação sendo capazes de inibir bacilos resistentes aos fármacos e que sejam potencialmente efetivos em bactérias intracelulares e não replicantes, ajudando a encurtar o atual tratamento da TB (VASAVA et al., 2017; WELLINGTON; HUNG, 2018).

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos constituem um processo lento e oneroso. Duas abordagens principais para a investigação de um novo medicamento anti-TB são

consideradas atualmente, uma delas é baseada na síntese de análogos de medicamentos, com o objetivo de encurtar e melhorar o tratamento da TB, a outra baseia-se na busca de novas estruturas nunca antes investigadas frente micobactérias (PAVAN et al., 2011). Uma outra estratégia é chamada de reposicionamento de fármacos, cujo objetivo principal é a aplicação de compostos já conhecidos e comercializados para novas indicações ou tratamento de outra doença (LAW et al., 2013).

O reposicionamento de fármacos tem o potencial de reduzir tanto o tempo quanto o custo associado ao desenvolvimento de medicamentos. As abordagens de reutilização, portanto, são promissoras para identificar moléculas que possam tratar uma variedade de doenças, incluindo doença infecciosa, sobretudo, com o aumento nos casos de resistência microbiana aos fármacos atualmente disponíveis e o surgimento de cepas mutantes. Essa abordagem pode ser uma excelente aliada para o estabelecimento de novas terapias antimicrobianas (AZMI, 2012; LAW et al., 2013).

A ferramenta de reposicionamento é frequentemente associada à descoberta de um novo mecanismo de ação e elucidação de um novo alvo molecular, uma vez que a maioria das moléculas pequenas podem apresentar múltiplos alvos. É uma estratégia que recuperou o interesse das empresas farmacêuticas e cientistas acadêmicos por seu potencial para reduzir os investimentos, desencorajar atividades clínicas e encurtar o tempo necessário para comercializar uma molécula para seu novo uso (MAITRA et al., 2016; ANDRESEN; GJERTSEN, 2017).

Nesse projeto foi desenvolvida uma abordagem, envolvendo a investigação de uma estrutura que ainda não foi testada frente a TB. Seguindo a ideia de reposicionamento, trabalhamos, neste caso, com uma proposta de reutilização de uma molécula que já é aplicada para outros fins, porém nunca descrita como fármaco.

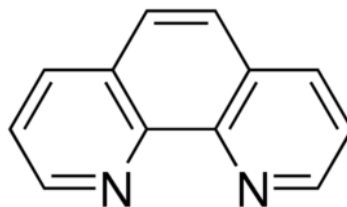
1.6 Complexos Metálicos e *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II)

O uso dos ligantes bipyridina (bipi) e fenantrolina (fen) tem sido extensivamente estudado por décadas por serem quimicamente versáteis, exibindo uma feliz combinação de propriedades estrutural e química. Estes tipos de ligantes foram amplamente empregados para se obter muitos benefícios, especialmente em combinação com diferentes metais de transição, encontrando diversas aplicações na terapêutica (GAO et al., 2016).

A 1,10-fenantrolina (1,10-fen), 2,2'-bipiridina (2,2'-bipi) e seus derivados, tanto no estado livre de metal ou coordenados com metais, perturbam o funcionamento de uma grande variedade de sistemas biológicos (MCCANN et al., 2004).

1,10-fen (Figura 4) é um composto heterocíclico contendo nitrogênio, conhecido como um ligante bidentado, clássico em química de coordenação, com grande potencial quelante para íons de metais de transição (BENCINI; LIPPOLIS, 2010). No ligante fen, quando as bases de N, N-quelantes estão isentas de metal são consideradas bioativas e geralmente supõe-se que o processo de sequestro de metais traços esteja envolvido, formando assim, complexos metálicos, que são considerados as espécies reais ativas (MCCANN et al., 2004).

Figura 4 – Estrutura química de 1,10-fenantrolina



Fonte: Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24848008>> Acesso em: 25/08/18.

Derivados de 1,10-fen destacam-se especialmente devido aos seus efeitos biológicos, suas aplicações em ciência dos materiais, em engenharia de cristais e por suas propriedades de complexação. Esqueletos policíclicos de fen também estão presentes em esteróis, hormônios sexuais, glicosídeos cardíacos, ácidos biliares e morfina (MATARNEH et al., 2016).

Alguns quelantes de metais de transição são altamente ativos em sistemas biológicos. Em estudos, 1,10-fen tem demonstrado mediar a morte microbiana em virtude de sua capacidade de se ligar ao DNA, ou por inibir a síntese da acetil-coenzima A, ou ainda, pela própria ação de quelar-se aos íons metálicos biológicos (KIDWAI et al., 2017).

Foi relatado que alguns complexos metálicos de fen podem ser bacteriostáticos ou bactericidas para diferentes bactérias diante a experimentos *in vitro*, porém, a maior parte deles são excluídos dos estudos por apresentarem toxicidade frente células eucarióticas e por serem extremamente tóxicos nos ensaios *in vivo*, principalmente frente camundongos e ratos (MCCANN et al., 2000, 2004). Em estudos prévios realizados pelo Laboratório de Pesquisa em Tuberculose da UNESP, foi investigada a atividade de diferentes complexos metálicos, em

especial moléculas contendo fen e rutênio (II) (Ru (II)), que demonstraram atividade promissora contra o *M. tuberculosis in vitro*, sendo observado nesses casos que o complexo como um todo mostrou-se diversas vezes mais ativo que seus ligantes livres (PAVAN et al., 2010, 2011).

Kidway et al. (2017) também relata, que complexos de fen-metal demonstraram inibir o crescimento de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium difficile* resistentes a fármacos e também inibem a formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, além de apresentar atividade fungistática (KIDWAI et al., 2017). Derivados químicos utilizando fen, íon cobre (Cu) (II) e a molécula da cumarina mostraram-se exercer a atividade antimicrobiana, antioxidante e antitubercular (DHOLARIYA et al., 2013).

Estudos mais antigos já investigavam atividade biológicas de quelatos de metais com fen e indicam que a velocidade de ação bactericida depende da natureza e propriedades do íon metálico e do ligante, isto é, nas características do complexo como um todo. Como os quelatos lábeis se mostravam ser mais rápidos, parecia provável que ação bactericida seria devido ao ligante fen ou então a um derivado contendo metal, formado no meio ou dentro da bactéria (BUTLER et al., 1969).

Moléculas mais complexas, mas que também continham em sua estrutura a fen e diferentes metais como prata (Ag (I)), manganês (Mn (II)) e Cu (II) também apresentaram atividades, que se diferenciavam dependendo do metal utilizado, indicando assim que as propriedades do íon metálico também interferem no modo de ação (COYLE et al., 2003, 2004).

Outra característica interessante em relação à complexação de metais é a capacidade em melhorar a atividade biológica de antibióticos. O ligante quinolona, por exemplo, devido a sua lipossolubilidade aumentada, quando complexado ao metal, tem-se uma maior facilidade no acúmulo intracelular e a coordenação de quinolona com cobre resulta em um aumento sinérgico de sua atividade antibacteriana. Complexos de metal com outros medicamentos antituberculosos, como a INH, também apresentam relatos de melhora nas atividades antibacterianas em comparação com as moléculas dos fármacos de origem (SAHA; PATITUNGKHO; PADHYE, 2005). Em geral, a coordenação de íons metálicos para agentes terapêuticos melhora sua eficácia e acelera a bioatividade (DHOLARIYA et al., 2013).

Diante disso, é possível afirmar que uma grande variedade de sistemas biológicos é afetada pelas próprias bases e também por seus complexos metálicos. Os efeitos, no entanto, são geralmente distintos, ficando evidente que princípios inteiramente diferentes estão envolvidos no modo de ação biológico para cada tipo de complexo.

Quando se trata de ambiente biológico, as moléculas capazes de formar complexos, ou seja, os ligantes livres, podem se ligar a íons metálicos que estão presentes no meio ou no fluido biológico, ou então a íons ligados à proteína por ligações de enxofre e/ ou nitrogênio. Assim, o íon metálico pode ficar indisponível para o sistema se a estabilidade do complexo formado for alta, e por outro lado, numa situação em que o íon metálico está ligado a uma superfície de proteína, pode-se ocorrer a inibição de enzimas por moléculas que irão se complexar. Dependendo da situação, a própria molécula orgânica pode ser o agente biológico eficaz sem a intervenção de um íon metálico ou então o complexo metálico formado é o responsável pela atividade (BRANDT; GYARFAS, 1954).

No caso de complexos metálicos já sintetizados e então administrados em ambientes biológicos, onde estarão como moléculas coordenadas saturadas e altamente estáveis quimicamente, é considerada a ideia de as próprias moléculas entrarem em reações químicas, nas quais esses complexos não devem ser afetados, devido a essa estabilidade (BRANDT; GYARFAS, 1954).

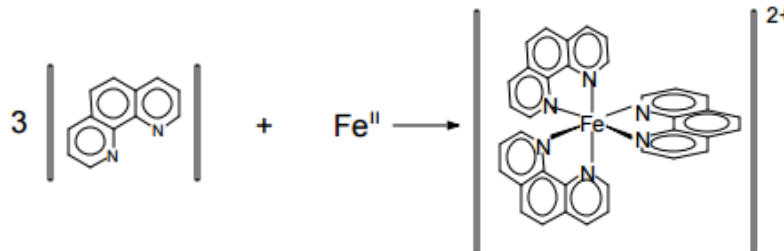
Várias observações devem ser consideradas para a tentativa de entendimento da ação de complexos em meio biológico. Numa investigação onde se testou ligantes (bipi e fen) variando os íons metálicos ferro, rutênio, ósmio, cobalto e zinco (Fe, Ru, Os, Co e Zn.), descobriu-se que, quando o ligante é alterado o efeito biológico é bastante diferente. Estas observações indicam que a atividade é devida ao complexo como um todo e não aos seus fragmentos dissociados. Como nenhuma alteração química está envolvida, o modo de ação deve ser puramente físico, como a adsorção, por exemplo. As moléculas são fortemente adsorvidas em uma proteína e, provavelmente, em locais negativos. Como resultado da carga positiva presente nessas moléculas, elas podem alterar o ponto isoelétrico de proteínas e podem despolarizar superfícies carregadas. Ao ocupar sítios negativos, podem bloquear pontos ativos em enzimas. Qualquer que seja o efeito, é causado em virtude de sua carga positiva ou por sua mera presença em um sítio ativo (BRANDT; GYARFAS, 1954).

O ferro é o segundo metal mais abundante depois do alumínio e o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre. É um elemento essencial para o reino animal e vegetal, e de grande importância para a microbiologia, desempenhando papéis vitais em uma variedade de processos bioquímicos, por ser um dos micronutrientes essenciais. O elemento ferro pode formar complexos de grande estabilidade nos estados bi e trivalente, como tris-quelatos vermelhos com o ferro (II) (BRANDT; GYARFAS, 1954; SHYLA; BHASKAR; NAGENDRAPP, 2012).

Sabe-se que alguns complexos de ferro com diferentes moléculas apresentaram atividade antimicrobiana. TARALLO (2010) e colaboradores sintetizaram complexos de ferro que se mostraram bacteriostáticos ou bactericidas contra *M. tuberculosis*, *in vitro*, demonstrando citotoxicidade muito baixa em células eucarióticas (TARALLO et al., 2010).

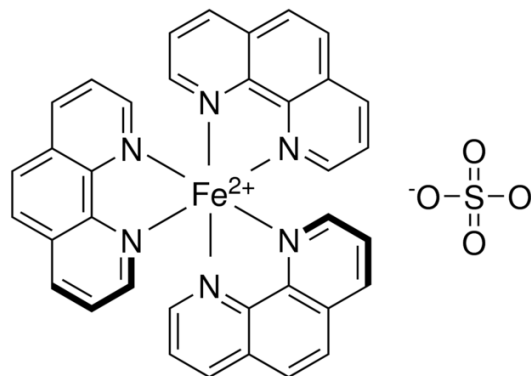
A complexação da molécula de 1-10-fenantrolina com ferro (II) leva ao complexo metálico, *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II), $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, (Figura 5). A interconversão entre o complexo ferroso intensamente vermelho, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e o complexo férrico azul, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{3+}$, é pensado para ser rápido e reversível na maioria dos casos (BELLÉR; LENTE; FÁBIÁN, 2010). O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, ilustrado na figura 6, exibe grande potencial redox e tem sido amplamente utilizado como precursor de outras reações químicas, além disso, já é descrita também alguma atividade biológica inicial, como atividade anti-fúngica, porém, não há relatos de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ ser utilizado como fármaco (BOTTEGA et al., 2016).

Figura 5 – Ilustração da reação de formação do complexo de Fe^{2+} com a 1,10-fenantrolina



Fonte: BREITKREITZ (2014).

Figura 6 – Estrutura química de *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) - $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$



Fonte: Disponível em <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/329749277> Acesso em: 28/08/2018.

A estabilidade termodinâmica desse tipo de complexo é maior devido principalmente à natureza hidrofóbica da fen e a consequente maior dessolvatação de cátions de metal após a formação do complexo (DHOLARIYA et al., 2013; KIDWAI et al., 2017).

Vários trabalhos relatam a investigação de compostos que utilizam 1,10-fen e metais, como discutido anteriormente. Entretanto, a maioria dos estudos tratam-se da adição de grupos químicos mais complexos que auxiliam na diminuição de toxicidade ou na própria ação biológica. ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) se destaca por exibir uma estrutura simples e facilidade de síntese, além de ser solúvel em água e apresentar baixo custo para sua obtenção, fatores relevantes para o tratamento e controle da TB, considerando a problemática da doença que atinge o mundo todo, principalmente países mais pobres (BRANDT; GYARFAS, 1954; HONG; KIM, 2018).

Diante disso, seguindo a estratégia de trabalhar com reutilização e nova aplicação da molécula de ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), investigou-se nesse trabalho, pela primeira vez, os potenciais contra TB desse complexo, uma vez que a doença foi subexplorada na questão de terapias baseadas em metais (STRINGER et al., 2017).

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos através desse trabalho podemos caracterizar o complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) como um promissor candidato à fármaco para tratamento da TB. Através das metodologias aplicadas para se avaliar a atividade do complexo frente ao *M. tuberculosis* foi possível determinar uma eficaz atividade contra micobactérias sensíveis em diferentes condições de meio de cultura. ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) apresentou atividade em bacilos no estado não-replicante, caracterizado como TB latente; foi ativo em cepas com perfis de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da doença. Além disso apresentou ótima inibição de bacilos intracelulares comparável a RFP, fármaco de primeira linha do tratamento da TB.

O complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) apresentou um perfil não mutagênico em ensaios de micronúcleo e baixa citotoxicidade frente as linhagens de células testadas (macrófagos J774A.1, fibroblastos MRC-5 e hepatócitos HepG2), exibindo um favorável índice de seletividade contra *M. tuberculosis*. Demonstrou também ter um espectro estreito de ação, sendo específico na inibição de micobactérias.

Na investigação de possíveis mecanismos de ação de ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) em inibir o *M. tuberculosis* podemos classificá-lo como potencial inibidor de síntese proteica micobacteriana, não excluindo a possibilidade de outras vias e outros alvos de inibição do bacilo. A seleção de cepas mutantes resistentes ao complexo está em execução para sequenciamento e identificação das mutações, a fim de se determinar de forma mais específica qual o(s) alvo(s) que ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) atinge para inibir os bacilos.

No ensaio em que investigamos o perfil de biodisponibilidade oral, o complexo demonstrou após 2h de sua aplicação estar biodisponível nos plasmas dos animais tratados e apresentou pico na concentração plasmática em 6h.

Portanto, os resultados em relação a atividade de ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) contra o *M. tuberculosis* foram satisfatórios. Considerando que a doença da TB apresenta formas peculiares e distintas de patogênese sendo muitas vezes de difícil tratamento, uma molécula que atue nessas formas, seja de baixo custo e fácil acesso, desperta interesse direcionado ainda maior no avanço da investigação de segurança e eficácia, a fim de classificá-la como um promissor fármaco que possa ajudar no controle e tratamento dessa doença mundialmente disseminada.

6. REFERÊNCIAS

ABDELRAHMAN, M. A.; SALAMA, I.; GOMAA, M. S.; ELAASSER, M. M.; ABDEL-AZIZ, M. M.; SOLIMAN, D. H. Design, synthesis and 2D QSAR study of novel pyridine and quinolone hydrazone derivatives as potential antimicrobial and antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 698–714, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.004>>.

ANDRADE, C. H.; PASQUALOTO, K. F. M.; ZAIM, M. H.; FERREIRA, E. I. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 167–179, 2008.

ANDRESEN, V.; GJERTSEN, B. T. Drug Repurposing for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Medicine**, v. 4, n. 211, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00211/full>>.

ANDRIES, K.; NEEFS, J.; WINKLER, H.; GESTEL, J. Van; TIMMERMAN, P.; ZHU, M.; LEE, E.; WILLIAMS, P.; CHAFFOY, D. De; HUITRIC, E.; HOFFNER, S.; CAMBAU, E.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LOUNIS, N.; JARLIER, V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, n. 223, p. 222–227, 2005.

ANKRAH, A. O.; GLAUDEMANS, A. W. J. M.; MAES, A.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R. A. J. O.; VORSTER, M.; SATHEKGE, M. M. Tuberculosis. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 48, n. 2, p. 108–130, 2017.

ARBEX, M. A. VARELLA, M. C. L.; SIQUEIRA, H. R.; DE MELLO, F. A. F. Artigo de Revisão: Drogas antituberculose: interações, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte I: Fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 626–640, 2010.

AZMI, A. S. Network pharmacology for cancer drug discovery: are we there yet? **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 939–941, 2012. Disponível em: <<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.12.44>>.

BARTLETT, J. G. Tuberculosis and HIV Infection: Partners in Human Tragedy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. s1, p. 124–125, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/518668>>.

BELLÉR, G.; LENTE, G.; FÁBIÁN, I. Central role of phenanthroline mono-N-oxide in the decomposition reactions of tris(1,10-phenanthroline)iron(II) and iron(III) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 3968–3970, 2010.

BENCINI, A.; LIPPOLIS, V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 17–18, p. 2096–2180, 2010.

BOTTEGA, F.C.; OLIVEIRA, M.R.L.; RUBINGER, M.M.M.; BELLATO, C.R.; ARDISSON, J.D.; ZAMBOLIM, L. Sais de tetrafenilfosfônio e tris (1,10fenantrolina)ferro(II) de complexos aniônicos de dibutilenstanho(IV) com ditiocarbimatos: síntese, caracterização e

atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 554-560, 2016.

BRANDT, W. W.; DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C. Chelate Complexes of 1,10-phenanthroline and related compounds. **Department of Chemistry, University of Sydney**, 34 p., 1954.

BREITKREITZ, M. C.; DE SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com orto-fenantrolina. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

BRENNAN, P. J. YOUNG, D. B.; ROBERTSON, B. D. Handbook of Anti-Tuberculosis Agents (Tuberculosis). **Global Alliance for TB Drug Development - Elsevier Health**, v. 88, n. 2, p. 85-170, 2008.

BUTLER, H. M.; HURSE, A.; THURSKY, E.; SHULMAN, A. Bactericidal Action of Selected Phenanthroline Chelates and Related Compounds. **The Australian Journal of Experimental Biology Medical**, v. 47, n. 5, p. 541-552, 1969. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/icb.1969.148>>.

CAILLEAUX-CEZAR, M. Diagnosis and Treatment of Latent Tuberculosis. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 41-45, 2012.

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; AMARAL, R. C. R.; DEMITTO, F. O.; MALTEMPE, F. G.; CANEZIN, P. H.; SCODRO, R. B. L.; NAKAMURA, C. V.; LEITE, C. Q. F.; SIQUEIRA, V. L. D.; CARDOSO, R. F. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. **Tuberculosis**, v. 97, p. 65-72, 2016.

CANEZIN, P. H.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; SCODRO, R. B. L.; SIQUEIRA, V. L. D.; PAVAN, F. R.; BARROS, I. L. E.; CARDOSO, R. F. Intramacrophage *Mycobacterium tuberculosis* efflux pump gene regulation after rifampicin and verapamil exposure. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1770-1776, 2018.

CHAUDHARI, K.; SURANA, S.; JAIN, P.; PATEL, H. M. *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) GyrB inhibitors: An attractive approach for developing novel drugs against TB. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 160-185, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.034>>.

CHIN, K. L.; ANIS, F. Z.; SARMIENTO, M. E.; NORAZMI, M. N.; ACOSTA, A. Role of Interferons in the Development of Diagnostics, Vaccines, and Therapy for Tuberculosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 10 p., 2017.

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.

CITRON, K. M.; ANGEL, J. H.; CAMPBELL, I. A. Short course chemotherapy in pulmonary tuberculosis. A controlled trial by the British Thoracic and Tuberculosis Association. **The Lancet**, v. 2, n. 7995, p. 1102-1104, 1976.

COYLE, B.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; GERAGHTY, M. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu (II), Mn (II) and Ag (I) complexes. **BioMetals**, v. 16, p. 321–329, 2003.

COYLE, B.; KINSELLA, P.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; O'CONNOR, R.; CLYNES, M.; KAVANAGH, K. Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 63–70, 2004.

DA SILVA, P. E. A.; PALOMINO, J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and new drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1417–1430, 2011.

DAVID, H. L.; CLAVEL, S.; CLEMENT, F.; MONIZ-PEREIRA, J. Effects of antituberculosis and antileprosy drugs on mycobacteriophage D29 growth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 2, p. 357–359, 1980.

DE FREITAS, E. S.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; BATISTA, A. A.; DE OLIVEIRA LOPES, É.; DA SILVA, M. M.; LEITE, C. Q. F.; PAVAN, F. R. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in Vitro cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5999–6008, 2014.

DEVASUNDARAM, S.; KHAN, I.; KUMAR, N.; DAS, S.; RAJA, A. The influence of reduced oxygen availability on gene expression in laboratory (H37Rv) and clinical strains (S7 and S10) of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 70–80, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.017>>.

DHEDA, K.; GUMBO, T.; MAARTENS, G.; DOOLEY, K. E.; MCNERNEY, R.; MURRAY, M.; FURIN, J.; NARDELL, E. A.; LONDON, L.; LESSEM, E.; THERON, G.; VAN HELDEN, P.; NIEMANN, S.; MERKER, M.; DOWDY, D.; VAN RIE, A.; SIU, G. K. H.; PASIPANODYA, J. G.; RODRIGUES, C.; CLARK, T. G.; SIRGEL, F. A.; ESMAIL, A.; LIN, H. H.; ATRE, S. R.; SCHAAF, H. S.; CHANG, K. C.; LANGE, C.; NAHID, P.; UDWADIA, Z. F.; HORSBURGH, C. R.; CHURCHYARD, G. J.; MENZIES, D.; HESSELING, A. C.; NUERMBERGER, E.; MCILLERON, H.; FENNELLY, K. P.; GOEMAERE, E.; JARAMILLO, E.; LOW, M.; JARA, C. M.; PADAYATCHI, N.; WARREN, R. M. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. **The Lancet Respiratory Medicine Commission**, v. 5, n. 4, p. 291–360, 2017.

DHOLARIYA, H. R.; PATEL, K. S.; PATEL, J. C.; PATEL, K. D. S. Dicoumarol complexes of Cu (II) based on 1,10-phenanthroline : Synthesis, X-ray diffraction studies, thermal behavior and biological evaluation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 108, p. 319–328, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.096>>.

DOMINGO-GONZALEZ, R.; PRINCE, O.; COOPER, A.; KHADER, S. Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 1–58, 2016.

DOOKIE, N.; RAMBARAN, S.; PADAYATCHI, N.; MAHOMED, S.; NAIDOO, K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. **Journal of Antimicrobial**

Chemotherapy, v. 73, n. 5, p. 1138-1151, 2018.

DOS SANTOS FERNANDES, G. F.; DE SOUZA, P. C.; MORENO-VIGURI, E.; SANTIVAÑEZ-VELIZ, M.; PAUCAR, R.; PÉREZ-SILANES, S.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; LAZZARATO, L.; FRUTTERO, R.; MAN CHIN, C.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; SOLCIA, M. C.; RIBEIRO, C. M.; SILVA, C. S. P.; MARINO, L. B.; BOSQUESI, P. L.; HUNT, D. M.; DE CARVALHO, L. P. S.; DE SOUZA COSTA, C. A.; CHO, S. H.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; PAVAN, F. R.; DOS SANTOS, J. L. Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing Antitubercular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 8647–8660, 2017.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. **Methods in Molecular Biology**, v. 682, p. 217–234, 2007.

FRANZBLAU, S. G.; DEGROOTE, M. A.; CHO, S. H.; ANDRIES, K.; NUERMBERGER, E.; ORME, I. M.; MDLULI, K.; ANGULO-BARTUREN, I.; DICK, T.; DARTOIS, V.; LENAERTS, A. J. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 92, n. 6, p. 453–488, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2012.07.003>>.

GAO, E.; SUN, N.; ZHANG, S.; DING, Y.; QIU, X.; ZHAN, Y.; ZHU, M. Synthesis, structures, molecular docking, cytotoxicity and bioimaging studies of two novel Zn(II) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.013>>.

GAO, W.; KIM, J. Y.; ANDERSON, J. R.; AKOPIAN, T.; HONG, S.; JIN, Y. Y.; KANDROR, O.; KIM, J. W.; LEE, I. A.; LEE, S. Y.; MCALPINE, J. B.; MULUGETA, S.; SUNOQROT, S.; WANG, Y.; YANG, S. H.; YOON, T. M.; GOLDBERG, A. L.; PAULI, G. F.; SUH, J. W.; FRANZBLAU, S. G.; CHOA, S. The cyclic peptide ecumicin targeting CLpC1 is active against *Mycobacterium tuberculosis in vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 880–889, 2015.

GARAJ-VRHOVAC, V.; GAJSKI, G.; RAVLIĆ, S. Efficacy of HUMN criteria for scoring the micronucleus assay in human lymphocytes exposed to a low concentration of p,p'-DDT. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 6, p. 473–476, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18592119>>.

GOLDE, W. T.; GOLLOBIN, P.; RODRIGUEZ, L. L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. **Technique Lab Animal**, v. 34, n. 9, p. 39–43, 2005.

GORDON, S. V.; PARISH, T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. **Microbiology**, v. 164, n. 4, p. 437-439, 2018. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000601.v1>>.

GREEN, K. D.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Resistance in tuberculosis: What do we know and where can we go? **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013.

GRUPPO, V.; JOHNSON, C. M.; 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.

GYGLI, S. M.; BORRELL, S.; TRAUNER, A.; GAGNEUX, S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 354–373, 2017.

HASSAN, H. M.; GUO, H. L.; YOUSEF, B. A.; LUYONG, Z.; ZHENZHOU, J. Hepatotoxicity mechanisms of isoniazid: A mini-review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 12, p. 1427–1432, 2015.

HERZMANN, C.; DALLENGA, T.; KALINKE, U. Pulmonale Immunität bei Tuberkulose
Pulmonary Immune Mechanisms in Tuberculosis. **Pneumologie**, v. 35, 10 p., 2017.

HONG, J.; KIM, K. Neutral Red and Ferrioxalate as Reversible and Rapid Redox Materials for Redox Flow Batteries. **ChemSusChem**, v. 11, p. 1866–1872, 2018.

HOUBEN, R. M. G. J.; DODD, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. **PLOS Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1-13, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002152>>.

IOERGER, T. R.; O'MALLEY, T.; LIAO, R.; GUINN, K. M.; HICKEY, M. J.; MOHAIDEEN, N.; MURPHY, K. C.; BOSHOF, H. I. M.; MIZRAHI, V.; RUBIN, E. J.; SASSETTI, C. M.; BARRY, C. E.; SHERMAN, D. R.; PARISH, T.; SACCHETTINI, J. C. Identification of New Drug Targets and Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–13, 2013.

JYOTI, M. A.; ZERIN, T.; KIM, T.H.; HWANG, T. S.; JANG, W. S.; NAM, K. W.; SONG, H. Y. In vitro effect of ursolic acid on the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* and its cell wall mycolic acid. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, p. 17–24, 2015.

KIDWAI, S.; PARK, C.; MAWATWAL, S.; TIWARI, P.; JUNG, M. G.; GOSAIN, T. P.; KUMAR, P.; ALLAND, D.; KUMAR, S.; BAJAJ, A.; HWANG, Y.; SONG, C. S.; DHIMAN, R.; LEE, I. Y.; SINGH, R. Dual Mechanism of Action of 5-Nitro-1,10-Phenanthroline against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. 1–19, 2017.

KIM, H. W.; KIM, J. S. Treatment of Latent Tuberculosis Infection and Its Clinical Efficacy. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 81, p. 6–12, 2018.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, n. 1–2, p. 185–202, 1998.

LAW, G. L.; TISONCIK-GO, J.; KORTH, M. J.; KATZE, M. G. Drug repurposing: a better approach for infectious disease drug discovery? **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 5, p. 588–592, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2013.08.004>>.

LEÓN-DÍAZ, R.; MECKES, M.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; MOLINA-SALINAS, G. M.;

VARGAS-VILLARREAL, J.; TORRES, J.; LUNA-HERRERA, J.; JIMÉNEZ-ARELLANES, A. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 45–51, 2010.

LEUNG, C. C.; CHEE, C. B. E.; ZHANG, Y. Tuberculosis updates 2018: Innovations and developments to end TB. **Respirology**, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/resp.13244>>.

LÓPEZ-GARCÍA, S.; CASTAÑEDA-SANCHEZ, J. I.; JIMÉNEZ-ARELLANES, A.; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, L.; CASTRO-MUSSOT, M. E.; HERNÁNDEZ-SANCHÉZ, J.; LUNA-HERRERA, J. Macrophage activation by ursolic and oleanolic acids during mycobacterial infection. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14348–14364, 2015.

MACHADO, D.; PIRES, D.; PERDIGÃO, J.; COUTO, I.; PORTUGAL, I.; MARTINS, M.; AMARAL, L.; ANES, E.; VIVEIROS, M. Ion channel blockers as antimicrobial agents, efflux inhibitors, and enhancers of macrophage killing activity against drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–28, 2016.

MAITRA, A.; BATES, S.; SHAIK, M.; EVANGELOPOULOS, D.; ABUBAKAR, I.; MCHUGH, T. D.; LIPMAN, M.; BHAKTA, S. Repurposing drugs for treatment of tuberculosis: a role for non-steroidal anti-inflammatory drugs. **British Medical Bulletin**, v. 118, n. 1, p. 145–155, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bmb/article-lookup/doi/10.1093/bmb/ldw019>>.

MAITRE, T.; AUBRY, A.; JARLIER, V.; ROBERT, J.; VEZIRIS, N.; BERNARD, C.; SOUGAKOFF, W.; BROSSIER, F.; CAMBAU, E.; MOUGARI, F.; RASKINE, L. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 47, n. 1, p. 3–10, 2017.

MALINGA, L.; BRAND, J.; OLORUNJU, S.; STOLTZ, A.; VAN DER WALT, M. Molecular analysis of genetic mutations among cross-resistant second-line injectable drugs reveals a new resistant mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 4, p. 433–437, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.010>>.

MATARNEH, C. M. Al; MANGALAGIU, I. I.; SHOVA, S.; DANAC, R. Synthesis, structure, antimycobacterial and anticancer evaluation of new pyrrolo-phenanthroline derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 470–480, 2016.

MATTEELLI, A.; ROGGI, A.; CARVALHO, A. C. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 111–118, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729727>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3979688>>.

MCCANN, M.; COYLE, B.; MCKAY, S.; MCCORMACK, P.; KAVANAGH, K.; DEVEREUX, M.; MCKEE, V.; KINSELLA, P.; O'CONNOR, R.; CLYNES, M. Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)₂]ClO₄ (phendio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. **Biomaterials**, v. 17, n. 6, p. 635–645, 2004.

MCCANN, M.; GERAGHTY, M.; DEVEREUX, M.; O'SHEA, D.; MASON, J.; O'SULLIVAN, L. Insights into the mode of action of the anti-candida activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates. **Metal Based Drugs**, v. 7, n. 4, p. 185–193, 2000.

MCNERNEY, R.; TRAORÉ, H. A review: Mycobacteriophage and their application to disease control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 223–233, 2005.

MIRANDA, M. S.; BREIMAN, A.; ALLAIN, S.; DEKNUYDT, F.; ALTARE, F. The tuberculous granuloma: An unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 14 p., 2012.

MUIJSERS, R. B. R.; VAN DEN WORM, E.; FOLKERTS, G.; BEUKELMAN, C. J.; KOSTER, A. S.; POSTMA, D. S.; NIJKAMP, F. P. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 932–936, 2000.

NARENDER, M.; JASWANTH, S. B.; UMASANKAR, K.; MALATHI, J.; RAGHURAM REDDY, A.; UMADEVI, K. R.; DUSTHACKEER, A. V. N.; VENKAT RAO, K.; RAGHURAM, R. A. Synthesis, in vitro antimycobacterial evaluation and docking studies of some new 5,6,7,8-tetrahydropyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one schiff bases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 3, p. 836–840, 2016.

NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. v. 23, n. 3, p. 836-840, 2016.

OECD/OCDE - GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity, Acute Toxic Class Method. **OECD Guideline for Testing of Chemicals**, n. 423, p. 1–14, 2001.

O'FLAHERTY, S.; ROSS, R. P.; COFFEY, A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria: Review article. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 801–819, 2009.

OLIVEIRA, A. P. S.; SOUSA, J. F.; DA SILVA, M. A.; HILÁRIO, F.; RESENDE, F. A.; CAMARGO, M. S.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Estrogenic and chemopreventive activities of xanthenes and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Steroids**, v. 78, p. 1053-1063, 2013.

ORME, I. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943–1946, 2001.

PALOMINO, J.; 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.

PARISH, T; ROBERTS, D. M. Mycobacteria Protocols, Isolation and Characterization of Compound-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Molecular Biology**, vol. 1285, p. 317-328, 2015.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I. F.; LEITE, S. R. A.; 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. 10, p. 5099–5107, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.08.023>>.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; DO NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R. A.; 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.; SATO, D.N.; LEITE, C.Q.F. An Approach to the Search for New Drugs Against Tuberculosis, **Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance**, v. 15, cap. 5, p. 138-146, 2012. Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/31618. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/an-approach-to-search-for-new-drugs-against-tuberculosis>>

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 6, p. 399–407, 2008.

PIURI, M.; JACOBS, W. R.; HATFULL, G. F. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 12 p., 2009.

PODDER, B.; JANG, W. S.; NAM, K. W.; LEE, B. E.; SONG, H. Y. Ursolic acid activates intracellular killing effect of macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 738–744, 2015.

PUBCHEM – Open Chemistry Database. **Ferroun Indicator Solution**, SID: 329749277. Desenvolvida por National Center for Biotechnology Information, U.S. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/329749277>> Acesso em: 28/08/2018.

PUBCHEM – Open Chemistry Database. **Substance 1,10-Phenanthroline**, SID: 24848008. Desenvolvida por National Center for Biotechnology Information, U.S. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24848008>> Acesso em: 25/08/18.

RODRIGUES, L.; RAMOS, J.; COUTO, I.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: Correlation with antibiotic resistance. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 35, 2011.

ROSEMBERG, J. Mecanismo Imunitário Da Tuberculose Síntese E Atualização. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 1, p. 35–59, 2001. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X2001000100005>.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, 2007.

SAHA, D. K.; PATITUNGKHO, S.; PADHYE, S. Metalloantitubercular compounds Part 3 : Synthesis , crystal structure , spectroscopy , electrochemistry and antimycobacterial activity of the copper (II) ciprofloxacin (cfH) complex and its phenanthroline adduct. **Transition Metal Chemistry**, v. 30, p. 334–340, 2005

SALINA, E.; RYABOVA, O.; KAPRELYANTS, A.; MAKAROV, V. New 2-Thiopyridines as potential candidates for killing both actively growing and dormant *Mycobacterium tuberculosis* cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 55–60, 2014.

SATO, D. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase**. 2003. 76 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química,

Universidade Estadual Paulista, Araraquara. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/100761>>.

SAUNDERS, B. M.; BRITTON, W. J. Life and death in the granuloma: Immunopathology of tuberculosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 103–111, 2007.

SCHWARTZ, Y. S.; DUSHKIN, M. I.; VAVILIN, V. A.; MELNIKOVA, E. V.; KHOSCHENKO, O. M.; KOZLOV, V. A.; AGAFONOV, A. P.; ALEKSEEV, A. Y.; RASSADKIN, Y.; SHESTAPALOV, A. M.; AZAEV, M. S.; SARAIEV, D. V.; FILIMONOV, P. N.; KURUNOV, Y.; SVISTELNIK, A. V.; KRASNOV, V. A.; PATHAK, A.; DERRICK, S. C.; REYNOLDS, R. C.; MORRIS, S.; BLINOV, V. M. Novel conjugate of moxifloxacin and carboxymethylated glucan with enhanced activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1982–1988, 2006.

SEIFERT, M.; CATANZARO, D.; CATANZARO, A.; RODWELL, T. C. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

SHARMA, S.; KALIA, N. P.; SUDEN, P.; CHAUHAN, P. S.; KUMAR, M.; RAM, A. B.; KHAJURIA, A.; BANI, S.; KHAN, I. A. Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 94, n. 4, p. 389–396, 2014.

SHISHOO, C. J.; SHAH, S. A.; RATHOD, I. S.; SAVALE, S. S.; VORA, M. J. Impaired bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 53–67, 2001.

SHYLA, B.; BHASKAR, C. V.; NAGENDRAPPA, G. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Iron (III) oxidized nucleophilic coupling of catechol with o-tolidine / p-tolidine followed by 1 , 10-phenanthroline as new and sensitivity improved spectrophotometric methods for iro. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 86, p. 152–158, 2012.

SILVA, I. C.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; PAVAN, F. R. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 300-307, 2017.

SIRICILLA, S.; MITACHI, K.; WAN, B.; FRANZBLAU, S. G.; KUROSU, M. Discovery of a capuramycin analog that kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and its synergistic effects with translocase i inhibitors. **Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 4, p. 271–278, 2014.

SIRGEL, F.A.; WIID, I.J.; VAN HELDEN, P.D. Measuring minimum inhibitory concentrations in mycobacteria. **Methods in Molecular Biology**, v. 465, p.173-186, 2009.

SNEWIN, V. A.; GARES, M. P.; Ó GAORA, P.; 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.

SONG, L.; WU, X. Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 6, p. 421-429, 2016.

STRINGER, T.; SELDON, R.; LIU, N.; WARNER, D. F.; TAM, C.; CHENG, L. W.; LAND, K. M.; SMITH, P. J.; CHIBALE, K.; SMITH, G. S. Antimicrobial activity of organometallic

isonicotinyl and pyrazinyl ferrocenyl-derived complexes. **The Royal Society of Chemistry**, v. 20, 12 p., 2017.

SUN, Z.; XU, Y.; SUN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X.; HUANG, H.; LI, C. Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Is Associated with Efflux Pump Activity Independent of Resistance Pattern and Genotype. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 06, p. 525-535, 2014.

TANG, P.; JOHNSTON, J. Treatment of Latent Tuberculosis Infection. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 9, p. 371–379, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40506-017-0135-7>>.

TARALLO, M. B.; URQUIOLA, C.; MONGE, A.; PARAJÓN, B.; 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.07.005>>.

THOMAS, P.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. **Methods in Molecular Biology**, v. 682, p. 217–234, 2011.

TOUSIF, S.; SINGH, D. K.; MUKHERJEE, S.; AHMAD, S.; ARYA, R.; NANDA, R.; RANGANATHAN, A.; BHATTACHARYYA, M.; KAER, L. Van; KAR, S. K.; DAS, G. Nanoparticle-formulated curcumin prevents posttherapeutic disease reactivation and reinfection with *Mycobacterium tuberculosis* following isoniazid therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 739, p. 1–12, 2017.

UPADHYE, V.; MAJUMDAR, A.; GOMASHE, A.; JOSHI, D.; GANGANE, N.; THAMKE, D.; MENDIRATTA, D.; HARINATH, B. C. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* secretory serine protease blocks bacterial multiplication both in axenic culture and in human macrophages. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 41, n. 8, p. 569–576, 2009.

VARDEVANYAN, P. O.; ANTONYAN, A. P.; PARSADANYAN, M. A.; DAVTYAN, H. G.; KARAPETYAN, A. T. The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 35, n. 6, p. 527–533, 2003.

VASAVA, M. S.; BHOI, M. N.; RATHWA, S. K.; BORAD, M. A.; NAIR, S. G.; PATEL, H. D. Drug development against tuberculosis: Past, present and future. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 64, n. 4, p. 252–275, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijtb.2017.03.002>>.

WALKER, N. F.; MEINTJES, G.; WILKINSON, R. J. HIV-1 and the immune response to TB. **Future Virol.**, v. 8, p. 57-80, 2013.

WAYNE, L. G.; SOHASKEY, C. D. Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Annual Reviews Microbiology**, v. 55, p. 139-163, 2001.

WAYNE, P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth international supplement M100-S18. In: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. CLSI. Laboratory Quality Control Based on Risk Management; Approved Guideline. CLSI document EP23-ATM, 2008.

WELIN, A.; RAFFETSEDER, J.; EKLUND, D.; STENDAHL, O.; LERM, M. Importance of phagosomal functionality for growth restriction of *Mycobacterium tuberculosis* in primary human macrophages. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 5, p. 508–518, 2011.

WELLINGTON, S.; HUNG, D. T. The Expanding Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Drug Targets. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 5, pg. 696-714, 2018.

WHO - World Health Organization, Library Cataloguing-in-Publication Data. **Global Tuberculosis Report**, 2014.

WHO - World Health Organization, Library Cataloguing-in-Publication Data. **Global Tuberculosis Report**, 2016.

WHO - World Health Organization, Library Cataloguing-in-Publication Data. **Global Tuberculosis Report**, 2018.

WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. **Essential medicines and health products**, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **Global Tuberculosis Report**, 2017.

XU, J.; TASNEEN, R.; PELOQUIN, C. A.; ALMEIDA, D. V.; LI, S.; BARNES-BOYLE, K.; LU, Y.; NUERMBERGER, E. crossm Verapamil Increases the Bioavailability and Efficacy of Bedaquiline but Not Clofazimine in a Murine Model of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, p. 1–8, 2018.

YOUNGA, D.; VERRECK, F. A. W. Creativity in tuberculosis research and discovery. **Tuberculosis**, v. 92, n. SUPPL.1, p. 14–16, 2012.

ZIGNOL, M.; DEAN, A. S.; PH, D.; FALZON, D.; GEMERT, W. V.; WRIGHT, A.; DEUN, A. V.; PORTAELS, F.; PH, D.; LASZLO, A.; PH, D.; ESPINAL, M. A.; MÉNDEZ, A. P.; BLOOM, A.; AZIZ, M. A.; WEYER, K.; SC, D.; JARAMILLO, E.; NUNN, P.; FLOYD, K.; PH, D.; RAVIGLIONE, M. C. Special Report Twenty Years of Global Surveillance of Antituberculosis-Drug Resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 11, p. 1081–1089, 2016.

ZUMLA, A.; ATUN, R.; MAEURER, M.; MWABA, P.; MA, Z.; O'GRADY, J.; BATES, M.; DHEDA, K.; HOELSCHER, M.; GRANGE, J. Viewpoint: Scientific dogmas, paradoxes and mysteries of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tropical Medicine and International Health**, v. 16, n. 1, p. 79–83, 2011.