

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 16/03/2023.



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

Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (CAPES 7)



EMANUELA AMERICO MORANDIM

**“Avaliação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis in vitro* e
in vivo em modelo alternativo *Galleria mellonella* de análogos
monocetônicos de curcumina”**

Araraquara
São Paulo - Brasil
2021

EMANUELA AMERICO MORANDIM

“Avaliação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* e *in vivo* em modelo alternativo *Galleria mellonella* de análogos monocetônicos de curcumina”

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

Área de concentração Bacteriologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Araraquara

São Paulo - Brasil

2021

M829a Morandim, Emanuela Americo.
Avaliação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis in vitro* e *in vivo* em modelo alternativo *Galleria mellonella* de análogos monocetônicos de curcumina / Emanuela Americo Morandim. – Araraquara: [S.n.], 2021. 65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Bacteriologia.

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Curcumina. 3. Análogos. 4. Atividade anti-tuberculose. 5. *Galleria mellonella*. I. Pavan, Fernando Rogerio, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da atividade anti-Mycobacterium tuberculosis in vitro e in vivo em modelo alternativo Galleria mellonella de análogos monocetônicos de curcumina

AUTORA: EMANUELA AMERICO MORANDIM

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. KATIANY RIZZIERI CALEFFI FERRACIOLI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Araraquara, 16 de março de 2021

Dedico esse trabalho ao meu pai, por todos os ensinamentos e exemplos de compaixão, humildade e honestidade, por ter sido o melhor pai que alguém poderia ter e por toda a falta que sua presença nos traz.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Ryan pelo privilégio de ser sua mãe, por me ensinar sobre o amor incondicional, por ser esse filho incrível e por me tornar uma pessoa melhor e mais forte todos os dias

Ao meu namorado Breno por todo o amor, carinho, ajuda, compreensão, por ser tão companheiro e dividir todos os momentos comigo, por ser a pessoa que eu sempre quis ter ao meu lado.

À minha família Américo e Morandim, minha mãe e meu irmão e todos os que se fizeram presentes e à minha família Barini por todo apoio, incentivo, carinho e amor.

A todos os amigos que o laboratório me presenteou, tive o prazer de conhecer e ter ao meu lado pessoas incríveis que me ajudaram muito em toda essa jornada.

Ao meu orientador pela oportunidade de trabalhar com essa pesquisa.

A CAPES, pela bolsa concedida para a execução desse trabalho.

RESUMO

A tuberculose (TB) é a doença infecciosa mais mortal do mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) foram relatados 10 milhões de novos casos mundiais de TB apenas em 2019, dentre eles houve 1,4 milhão de mortes. Atualmente a TB causa mais óbitos do que a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e é estimado que em 2050 as mortes por infecções bacterianas resistentes serão a causa número um. Devido a urgente necessidade na descoberta de novos fármacos para a TB e visto que há milhares de anos as plantas foram a fonte de praticamente todas as preparações medicinais, os produtos naturais empregam um importante papel na descoberta de novos medicamentos. A curcumina que está presente nos rizomas do açafrão e apresenta diversas bioatividades, incluindo a antibacteriana, foi empregada como base para a síntese de sete análogos monocetônicos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade destes análogos frente *Mycobacterium tuberculosis*, o principal agente causador da TB. A concentração inibitória mínima dos análogos foi entre 2,5 μM e 7,9 μM para bacilos sensíveis, o que é uma ótima inibição, e também inibiram de forma eficaz bactérias com perfil de resistência múltipla (MDR-TB) e extensivas (XDR-TB), sugerindo que esses análogos provavelmente apresentam um mecanismo de ação diferenciado. Em ensaios intramacrofágicos, os análogos foram capazes de inibir em até 80% as micobactérias contidas no interior do macrófago. Os análogos apresentam um excelente índice de seletividade com valores que chegam a 64,5 e de modo geral, foram menos tóxicos e mais seletivos para macrófago do que para fibroblastos pulmonares humanos e hepatócitos de carcinoma hepatocelular estudados nos ensaios de citotoxicidade. Os análogos podem ser caracterizados como substâncias de espectro de atividade estreito, por não apresentarem inibição frente a outros patógenos gram-positivos e gram-negativos testados e demonstraram ser compostos seguros em relação à toxicidade *in vivo* em *Galleria mellonella*. Com os resultados obtidos, os análogos monocetônicos de curcumina inéditos na literatura, demonstraram que são candidatos promissores a fármacos contra a TB, tanto para bactérias sensíveis quanto para bactérias resistentes, o que é essencial para o desenvolvimento de novas terapias anti-TB atualmente, além da baixa toxicidade encontrada.

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*; curcumina; análogos; atividade anti-tuberculose; *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the most deadly infectious disease in the world. According to the World Health Organization (WHO) 10 million new TB cases worldwide were reported only in 2019, of which there were 1.4 million deaths. Currently, TB causes more deaths than Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and it is estimated that in 2050 deaths from resistant bacterial infections will be the number one cause. Due to the urgent need to discover new drugs for TB and since plants were used as the source of almost all medicinal preparations for thousands of years, natural products play an important role in the discovery of new drugs. Curcumin is present in the turmeric rhizomes and has several bioactivities, including antibacterial, and it was used as a basis for the synthesis of seven monocarbonyl analogues. The objective of this work was to evaluate the activity of these analogues against *Mycobacterium tuberculosis*, the main causative agent of TB. The minimum inhibitory concentration of the analogues was between 2.5 μM and 7.9 μM for sensitive bacilli, which is an excellent inhibition, and they also effectively inhibited bacteria with multidrug-resistant (MDR-TB) and extensively drug-resistant (XDR-TB) profile, suggesting that these analogues probably have differentiated mechanisms of action. In intramacrophagic assays, the analogues were able to inhibit mycobacteria contained in the macrophage by up to 80%. The analogues have an excellent selectivity index with values reaching 64.5 and, in general, they were less toxic and more selective for macrophages than for human pulmonary fibroblasts and hepatocellular carcinoma hepatocytes studied in cytotoxicity assays. The analogues can be characterized as substances of narrow-spectrum activity, as they do not present inhibition against other tested gram-positive and gram-negative pathogens and have shown to be safe compounds, as they do not present toxicity *in vivo* in relation to the alternative model *Galleria mellonella*. From the obtained results, the monocarbonyl analogues of curcumin, unprecedented in the literature, demonstrate that they are promising candidates for drugs against TB, both for sensitive and resistant bacteria, which is essential for the development of new anti-TB therapies today, in addition to the low toxicity found.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; curcumin; analogues; anti-tuberculosis activity; *Galleria mellonella*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1. Número de casos mundiais incidentes de TB no ano de 2019.....	15
Figura 2. Estrutura da curcumina	25
Figura 3. Estrutura do análogo monocetônico de curcumina 1	27
Figura 4. Planejamento dos análogos monocetônicos de curcumina	28
Figura 5. Análogos monocetônicos de curcumina.	30

Capítulo II

Figure 1. Intramacrophagic activity of monocarbonyl analogues of curcumin. Press 5.0, one-way ANOVA, Bonferroni post test. * = Statistical significant difference found comparing the untreated group (T3) with all MIC concentrations of each monocarbonyl analogues of curcumin	54
Figure 2. Evaluation of the toxic potential of monocarbonyl analogues of curcumin tested in the highest concentration (2000 mg/kg)	57

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Estrutura, peso molecular (MW), coeficiente de partição n-octanol/água ($\log P_{o/a}$) e porcentagem de absorção intestinal humana (HIA) dos análogos monocetônicos de curcumina	29
--	----

Capítulo II

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC_{90}) of the monocarbonyl analogues of curcumin tested against <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv and four clinical isolates with profiles of resistance to antimicrobials.....	50
Table 2. Inhibitory concentration (IC_{50}) of the monocarbonyl analogues of curcumin tested in MRC-5, J774A.1 and HEPG2 in 24h and the selectivity index (SI).	52
Table 3. Concentration Values of the analogues used to perform the intramacrophagic activity in 1x MIC, 5x MIC and 10x MIC.....	53
Table 4. Spectrum activity of monocarbonyl analogues of curcumin against different gram-positive and gram-negative bacterial strains, calculation of 90% inhibitory concentration (MIC_{90}). Gentamicin was used as the control drug group.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: Acquired immunodeficiency syndrome

AMK: amikacin

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosina trifosfato

CF: Clemente Ferreira

CFU/ml: colony-forming unities per mL

CIM₉₀: concentração inibitória mínima para 90%

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

COVID-19: doença coronavírus/coronavirus disease

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

DMSO: dimethyl sulfoxide

EMB: etambutol/ethambutol

FDA: *Food and Drug Administration*

GAT: gatifloxacin

HIA: human intestinal absorption

HIV: human immunodeficiency virus

IC₅₀: inhibitory concentration for 50%

INH: isoniazida/isoniazid

INH^R: isoniazid resistant

IS: índice de seletividade

LB: Luria-Bertani

log $P_{o/a}$: coeficiente de partição n-octanol/água

MDR: multidroga resistente/multi drug resistant

MERS-CoV: Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MIC₉₀: minimum inhibitory concentration for 90%

MOI: Multiplicity of Infection

MW: molecular weight

nd: no determined

OADC: oleic acid, albumin, dextrose and catalase

OMS: Organização Mundial da Saúde

PZA: pirazinamida/pyrazinamide

REMA: *Resazurin Microtiter Assay*

RFP: rifampicina/rifampicin

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SARS-CoV: Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV 2: Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SI: selectivity index

TB: Tuberculose/Tuberculosis

TDR: totalmente resistente a fármacos

WHO: World Health Organization

XDR: extensivamente resistentes aos fármacos/extensively drug-resistant

SUMÁRIO

Capítulo I	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 A Tuberculose	14
1.2 Formas de transmissão e patogênese	17
1.3 O tratamento da TB e o desafio da resistência aos antimicrobianos.....	19
1.4 TB e COVID-19, o encontro das pandemias	21
1.5 Produtos Naturais	23
1.6 Curcumina e seus análogos	25
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
Capítulo II	40
1. Introduction	43
2. Material and method	45
2.1 Monocarbonyl analogues of curcumin, cell lines and bacterial strain.....	45
2.2 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC ₉₀) against <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv strain and clinical isolates with profiles of resistance to antimicrobials.....	46
2.3 Determination of inhibitory concentration (IC ₅₀) in eukaryotic cells.....	46
2.4 Determination of the selective index (SI)	47
2.5 Determination of Intramacrophagic Activity	47
2.6 Spectrum activity	48
2.7 Evaluation of acute toxicity <i>Galleria mellonella</i>	48
3. Results and Discussion	49
3.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC ₉₀) against <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv strain and clinical isolates with profiles of resistance to antimicrobials.....	49
3.2 Inhibitory concentration (IC ₅₀) in eukaryotic cells and selective index (SI)	51
3.3 Intramacrophagic Activity	53
3.4 Spectrum activity	55
3.5 Evaluation of acute toxicity <i>Galleria mellonella</i>	56
4. Conclusion	58
Acknowledgments	58
References	59

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Tuberculose

Há milênios a tuberculose (TB) existe e continua a ser um grande problema de saúde global. Somente em 2019, houve 1,4 milhão de mortes por TB, a principal causa global de mortalidade por doenças infecciosas (WHO, 2020). Estima-se que aproximadamente um quarto da população mundial esteja infectada com *Mycobacterium tuberculosis*, o principal agente causador da TB. Embora a maioria desses indivíduos seja portadora não sintomática e não contagiosa da infecção, o que se caracteriza como infecção latente por TB, 5 a 10% desenvolverão doença ativa sintomática e altamente contagiosa ao longo da vida (PAI et al., 2016; WHO, 2018).

A TB é uma preocupação mundial e atormenta a humanidade ao longo da história e da pré-história humana. Surgiu em grandes epidemias e depois recuou, comportando-se como outras doenças infecciosas, mas com uma escala de tempo que desafia as explicações aceitas para os ciclos epidêmicos. *M. tuberculosis* pode ter matado mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano (DANIEL, 2006).

A doença reivindicou suas vítimas ao longo de grande parte da história, pode-se supor que o gênero *Mycobacterium* se originou há mais de 150 milhões de anos. Técnicas modernas de genética molecular e o sequenciamento do genoma de várias linhagens de *M. tuberculosis* permitem uma estimativa mais rigorosa do tempo de origem das micobactérias, essa estimativa é facilitada pela sua baixa taxa de mutação. Gutierrez e seus colaboradores concluíram que um progenitor precoce de *M. tuberculosis* estava presente na África Oriental há 3 milhões de anos e eles sugerem que ele pode ter infectado hominídeos precoces naquela época (DANIEL, 2006; GUTIERREZ et al., 2005).

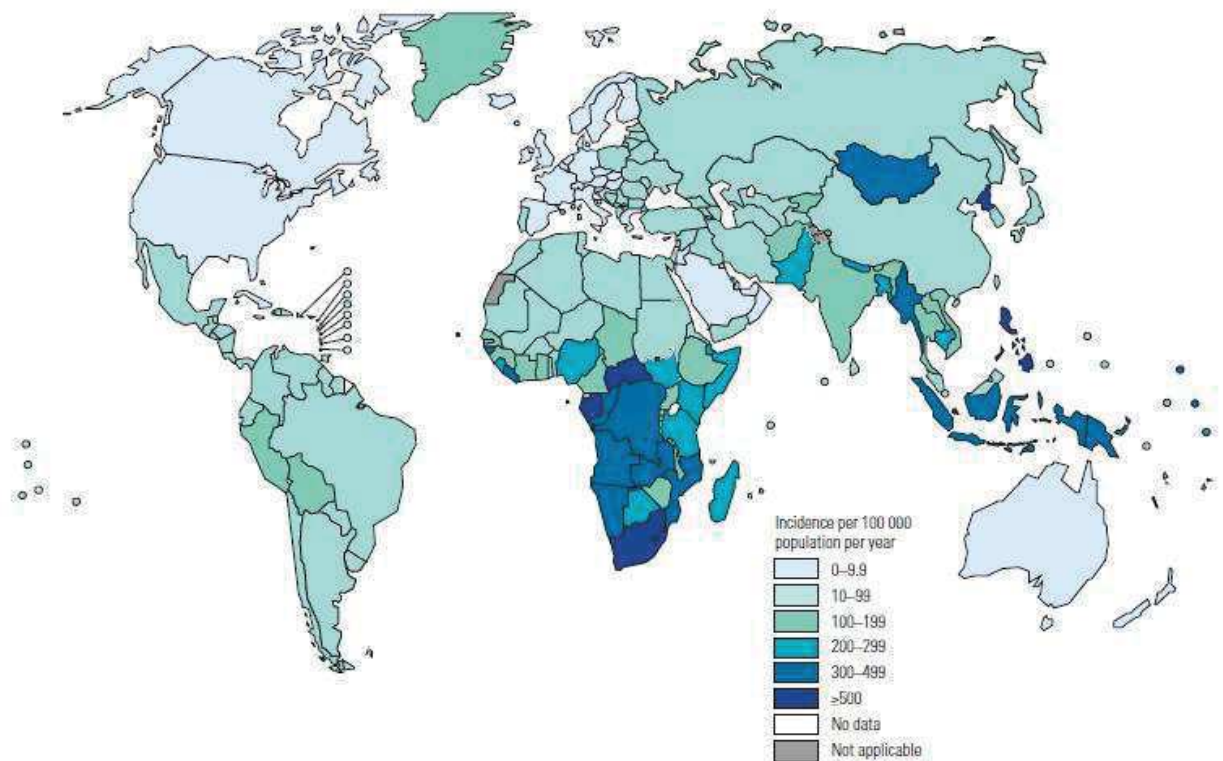
A TB já estava bem estabelecida na África Oriental quando os europeus chegaram à área no século 19, disseminando-se assim a doença com as migrações posteriores. Com o passar do tempo as aglomerações nas cidades europeias e, posteriormente, a revolução industrial na Europa, proporcionaram as condições ambientais necessárias para que a doença endêmica se tornasse epidêmica (BATES; STEAD, 1993).

A história da TB mudou drasticamente em 24 de março de 1882, quando Robert Koch fez sua apresentação chamada *Die Aetiologie der Tuberculose*, para a Sociedade Fisiológica de Berlim (DANIEL, 2005). Nela, Koch não apenas apresentou demonstrações do bacilo de tubérculo que havia identificado, mas também pleiteou seus famosos postulados chamados de

postulados de Koch-Henle, que até hoje definem o padrão para demonstração de etiologia infecciosa. As contribuições de Koch para a bacteriologia foram numerosas e, em 1905, ele recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por elucidar a etiologia da TB (DANIEL, 2006).

Dados da OMS demonstram que 10 milhões de novos casos mundiais de TB foram relatados no ano de 2019, sendo 56% homens, 32% mulheres e 12% crianças. Entre todos os casos de TB, 8,2% eram pessoas soropositivas ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Geograficamente, como demonstra a Figura 1, a maioria dos casos de TB em 2019 ocorreu nas regiões do Sudeste Asiático (44%), África (25%) e Pacífico Ocidental (18%), com porcentagens menores no Mediterrâneo Oriental (8,2%), nas Américas (2,9%) e Europa (2,5%). Oito países representaram dois terços do total global: Índia (26%), China (8,4%), Indonésia (8,5%), Filipinas (6%), Paquistão (5,7%), Nigéria (4,4%), Bangladesh (3,6%) e África do Sul (3,6%). Esses e outros 22 países da lista da OMS dos 30 países com alto índice de TB representaram 21% dos casos no mundo (WHO, 2020).

Figura 1. Número de casos mundiais incidentes de TB no ano de 2019. Fonte: WHO, 2020



Atualmente, no mundo como um todo, a taxa média de declínio foi de 1,7% ao ano no período de 2000 a 2019 e de 2,3% entre 2018 e 2019. A redução global no número total de mortes por TB entre 2015 e 2019 foi de 14%, menos da metade do caminho para o marco da Estratégia “End TB” que seria uma redução de 35% em 2020 (WHO, 2020).

A estratégia “End TB”, uma campanha global para acabar com a TB realizada pela OMS em 2015, visou alcançar uma redução nas mortes e na incidência de 95% e 90%, respectivamente, até 2035 (WHO, 2018). No entanto, apesar dos esforços globais, o progresso dessa estratégia foi prejudicado pelo financiamento insuficiente e um dos pilares fundamentais da estratégia “End TB” é intensificar a pesquisa e a inovação, com a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias antimicobacterianas mais eficazes e seguras (REID et al., 2019).

A bactéria *M. tuberculosis* possui vários recursos notáveis: a capacidade de entrar em estados não replicantes por longos períodos e causar infecção latente, remodelação metabólica durante infecção crônica, uma parede celular espessa e cerosa, baixa taxa de crescimento em cultura, resistência intrínseca e tolerância a antibióticos. A bactéria é um bacilo aeróbico de crescimento lento, o tempo de replicação é de aproximadamente 24 horas em condições ideais de laboratório a 37°C, levando em torno de três semanas para formar colônias ásperas e de cor amarela em placas de ágar. (DAFFÉ; ETIENNE, 1999; MIGLIORI et al., 2007).

O bacilo é visualizado por meio da coloração rápida Ziehl-Neelsen, pela qual sua parede espessa e cerosa retém a coloração de carbolfucsina frente a lavagens ácido-álcool. Sua parede celular é característica das micobactérias, embora sejam classificadas como Gram-positivas, elas possuem uma estrutura semelhante à das bactérias Gram-negativas com uma segunda “membrana externa” que contém os ácidos micólicos – ácidos graxos ramificados de cadeia longa (GILL et al., 2009; KOCH; MIZRAHI, 2018). A camada externa da membrana citoplasmática forma um complexo maior, com uma camada espessa de peptidoglicano ligado ao arabinogalactano, por sua vez ligado aos ácidos micólicos (GORDON; PARISH, 2018).

M. tuberculosis é um patógeno intracelular, capaz de parasitar fagócitos mononucleares humanos, passando a maior parte do seu ciclo de vida em macrófagos, multiplicando-se dentro do fagossomo e permanecendo inativo por alguns anos sem apresentar sintomas, mas quando há uma queda no sistema imunológico do hospedeiro, *M. tuberculosis* dormente se torna ativo e causa a infecção (VASAVA et al., 2017).

1.2 Formas de transmissão e patogênese

A TB é distinta entre as doenças infecciosas, na medida em que é transmitida quase exclusivamente pelo ar, é necessário a expulsão de bacilos do pulmão de uma pessoa infectada e sua liberação no ar circundante. Embora se presuma que a tosse é a principal maneira pela qual a bactéria *M. tuberculosis* passa de um hospedeiro humano para o meio ambiente, devemos levar em consideração que a respiração, a fala e outras manobras respiratórias podem dar importantes contribuições para a disseminação do bacilo (TURNER; BOTHAMLEY, 2015).

Quando o bacilo é inalado e chega aos pulmões, este pode ser completamente eliminado pelo sistema imunológico, ou pode ser contido em estado de latência ou dar origem a uma infecção ativa. O resultado depende do estado imunológico do hospedeiro, podendo este ter um sistema imunológico eficaz eliminando a bactéria completamente, ter um sistema imune ineficaz e desenvolver a doença ou ainda abrigar o bacilo em latência resultando na forma subclínica da doença (ANKRAH et al., 2018).

Em aproximadamente 5% dos indivíduos infectados o sistema imunológico é incapaz de conter a infecção inicial e a TB ativa se desenvolve nos primeiros 1-2 anos, essa categoria é conhecida como TB primária. Em outros 5% dos indivíduos infectados, o sistema imunológico é eficaz no controle dessa infecção inicial, mas as bactérias viáveis permanecem dormentes e reativam posteriormente, essa categoria é conhecida como TB pós-primária ou de reativação. Os 90% restantes são indivíduos que nunca desenvolverão a doença sintomática e abrigarão a infecção apenas em nível subclínico, conhecido como infecção latente, a qual os bacilos de *M. tuberculosis* persistem no hospedeiro em um estado de hipóxia, metabolicamente inativo ou de reprodução lenta (GORDON; PARISH, 2018; NACHIAPPAN et al., 2017).

É estimado que cerca de um quarto da população apresente essa forma da infecção em latência, na qual abrigam bacilos não infecciosos, para a maioria desses casos a bactéria permanece latente por muitos anos ou até durante toda a vida do hospedeiro. Entretanto, se o sistema imune do hospedeiro não puder conter as bactérias, o organismo terá oportunidade de progredir para uma infecção ativa e sintomática. Aproximadamente 5-15% dos indivíduos com TB latente desenvolverão a doença ativa, principalmente os expostos a perturbações imunes, como por exemplo o tratamento com fármacos imunossupressores, em doenças como o diabetes associado a deficiência imune e especialmente indivíduos co-infectados com HIV, sendo essa associação uma das principais causas de morte desses indivíduos (TANG; JOHNSTON, 2017). Em 2019 houve cerca de 208 mil mortes causadas pela TB em pessoas soropositivas para HIV,

esses indivíduos imunocomprometidos desenvolvem TB ativa devido à falha de seu sistema imunológico em controlar ou erradicar a infecção (WHO, 2020).

Os sintomas comuns da TB pulmonar ativa são tosse com escarro e às vezes com sangue, dores no peito, fraqueza, perda de peso, febre e suores noturnos. Muitas vezes, esses sintomas são leves por muitos meses, levando a atrasos na procura de cuidados e aumentando o risco de espalhar a infecção para outras pessoas (WHO, 2020).

Em pacientes que nunca foram expostos à bactéria, os receptores de reconhecimento e padrões expressos por macrófagos, células dendríticas e células epiteliais interagem com os ligantes de *M. tuberculosis*. Isso resulta na produção de citocinas inflamatórias e quimioquinas, recrutando novas células para o local da inflamação e iniciando a formação de granulomas pelo sistema imunológico inato (ANKRAH et al., 2018).

O granuloma é a marca registrada da TB, estes consistem em uma coleção de células imunológicas organizadas que se formam em resposta à infecção por *M. tuberculosis*. Geralmente consistem em macrófagos infectados e recrutados, células epitelióides diferenciadas, todas cercadas por uma camada de linfócitos (DIEDRICH; O'HERN; WILKINSON, 2016).

Pensa-se que os macrófagos alveolares estão entre as primeiras e mais importantes defesas do hospedeiro no local da infecção primária no pulmão e as células efetoras mais importantes encontradas por *M. tuberculosis* após a exposição ao bacilo. Geralmente, acredita-se que a capacidade da bactéria sobreviver à morte intracelular por macrófagos é o passo inicial no estabelecimento da infecção pelo TB. O bacilo parasita as células hospedeiras primeiro como estratégia para evitar a vigilância imune inata e, em segundo lugar, como local favorável para a replicação, mesmo diante de uma resposta celular adaptativa agressiva (KIRAN et al., 2016). Além disso, os macrófagos residentes são fundamentais para promover ou orquestrar as respostas inflamatórias precoces e, portanto, tem um papel no estabelecimento de uma resposta protetora ou destrutiva. Se as defesas iniciais do hospedeiro falharem em erradicar ou retardar significativamente o crescimento da bactéria, os macrófagos contribuem para o recrutamento complicado e dinâmico mediado por citocinas e quimioquinas de células inflamatórias adicionais, que formam a lesão infecciosa inicial (ORME; BASARABA, 2014).

Com o estabelecimento da infecção por *M. tuberculosis*, expansão das lesões e progressão da doença, os granulomas aumentam e sofrem alterações em suas características morfológicas, desenvolvendo lesões com necrose central e cavitação (KIRAN et al., 2016). O aparecimento de lesões com esses morfotipos representa uma importante transição não apenas

para danos irreversíveis ao tecido em alguns pacientes, mas também possibilitando potencialmente a disseminação do bacilo para outros tecidos e órgãos (IRWIN et al., 2015).

Embora a forma da TB mais conhecida seja a TB pulmonar, ela também pode afetar outros locais, tais como: os linfonodos, pleura, ossos e articulações, sistema nervoso central, órgãos intra-abdominais, entre outros (PANG et al., 2019). Essa forma da doença é chamada de TB extrapulmonar e representou 16% dos casos de incidentes que foram notificados em 2019 (WHO, 2020). As bactérias podem se espalhar através da disseminação linfática ou hematogênica para qualquer trato, a TB extrapulmonar pode afetar praticamente todos os órgãos, e dessa forma, apresenta grande variedade de manifestações clínicas, o que causa dificuldade e demora no diagnóstico (ARPAGAUS; WEISSER, 2019).

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

A terapêutica da TB possui algumas particularidades que a diferencia das outras doenças infecciosas e que causam uma grande dificuldade na adoção da mesma como o tempo de tratamento e a associação de antimicrobianos e/ou antiretrovirais. Um paciente com uma infecção sensível ao tratamento de primeira escolha/linha receberá no mínimo 6 meses de tratamento, enquanto aquele com uma infecção resistente receberá de 9 meses a 2 anos ou mais de uma terapêutica de segunda escolha/linha (HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015; WHO, 2020).

Atualmente, para esses pacientes que possuem a infecção sensível aos fármacos, em que o regime de tratamento é de 6 meses, são utilizados quatro medicamentos de primeira linha: isoniazida (INH), rifampicina (RFP), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA) (CHAUDHARI et al., 2016; WHO, 2020). Já para pacientes que possuem a infecção resistente a medicamentos, o tratamento pode ser prolongado por 2 anos, o quadro de antimicrobianos é bem extenso e dependerá do resultado do teste de sensibilidade a ser conduzido (HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015; WHO, 2020). Além disso, é importante ressaltar, que os regimes de tratamento nos casos de resistência são mais extensos, menos efetivos e menos acessíveis do que os de regime de primeira linha, além de serem mais caros e mais tóxicos (ZIGNOL et al., 2016).

TB resistente a antibióticos é uma crise de saúde pública e uma ameaça à segurança da saúde. A OMS estimou que cerca de 500.000 novos casos de TB multirresistente (MDR-TB) surgem a cada ano, mas apenas um em cada três casos foram relatados em 2018, ou seja, há subnotificação. Dentre esses casos, os que obtiveram sucesso no tratamento foram apenas 56%

para pacientes com MDR-TB e 39% para paciente com TB extensivamente resistentes aos fármacos (XDR-TB) (WHO, 2019).

TB multidroga resistente (MDR-TB) é definida como a forma da doença causada por bactérias que são resistentes ao tratamento com pelo menos dois dos medicamentos anti-TB de primeira linha mais eficientes, a INH e RFP (CHAUDHARI et al., 2016; WHO, 2020). No começo de 2021, a OMS criou uma nova categoria que foi classificada como pré-extensivamente resistente a medicamentos (pré-XDR-TB) que é definida como a forma MDR-TB e adicionalmente resiste a qualquer fluoroquinolona. A definição da TB extensivamente resistente a medicamentos (XDR-TB) também foi atualizada e é definida como a forma pré-XDR-TB e adicionalmente resistente a pelo menos um medicamento do Grupo A, que são levofloxacina, moxifloxacina, bedaquilina e linezolida (WHO, 2020). Há também a TB totalmente resistente a fármacos (TDR-TB) onde a doença possui resistência a todos os medicamentos disponíveis de primeira e segunda linha, deixando os pacientes sem outras opções de tratamento (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014).

A descoberta de novos fármacos ficou estagnada por longos anos, após 4 décadas do surgimento da RFP, somente dois novos fármacos foram aprovados para o tratamento específico para casos de MDR-TB: a bedaquilina, que desempenha sua atividade contra a bactéria inibindo a produção de ATP micobacteriano, e a delamanida, que atua na biossíntese da parede micobacteriana promovendo a inibição do ácido micólico (MAHAJAN, 2013; WHO, 2020; XAVIER; LAKSHMANAN, 2014).

Os medicamentos utilizados no tratamento anti-TB atuam em *M. tuberculosis* por meio de três mecanismos principais: bloqueando enzimas envolvidas na síntese de componentes da parede celular, interrompendo a síntese de proteínas no nível dos ribossomos e impedindo vários processos em relação ao DNA, como por exemplo a síntese de RNA/DNA (NASIRI et al., 2017). Nos medicamentos de primeira linha utilizados, a INH desempenha sua função inibindo a biossíntese dos ácidos micólicos e a PZA inibe a síntese de ácidos graxos, já a RFP atua inibindo a RNA polimerase micobacteriana e, portanto, a síntese de RNA e o EMB exerce seu efeito bloqueando a enzima que sintetiza o arabinogalactano, utilizado na parede celular bacteriana (ROSSETTI et al., 2002).

Embora os mecanismos de resistência aos medicamentos anti-TB não sejam totalmente compreendidos, observou-se que são direcionados principalmente pela aquisição de mutações em genes específicos que codificam os alvos dos fármacos ou enzimas ativadoras de fármacos. Outra característica importante de *M. tuberculosis* é sua parede celular ser altamente hidrofóbica, dificultando assim a atividade de alguns fármacos e ainda a ação de bombas de

efluxo, proporcionando mais formas do microrganismo escapar das terapias antimicrobianas (DEELDER et al., 2019; DOOKIE et al., 2018).

A resistência antimicrobiana ocorre naturalmente ao longo do tempo, geralmente através de alterações genéticas, porém, o uso indevido e excessivos de antimicrobianos está acelerando esse processo (WHO, 2020). A resistência a medicamentos surge quando os medicamentos anti-TB são usados de forma inadequada, mediante prescrição incorreta por prestadores de serviços de saúde, medicamentos de baixa qualidade e pacientes que interrompem o tratamento prematuramente resultando não apenas na resistência a medicamentos, mas também na falha do tratamento e até mesmo à morte. Devido ao longo tempo de tratamento, quando os pacientes já estão assintomáticos, estes geralmente interrompem o tratamento prematuramente, pois não sentem necessidade de continuarem a serem tratados. Essa interrupção impede a eliminação total da bactéria no organismo do paciente, podendo assim, selecionar as resistente aos antibióticos anti-TB (CHAUDHARI et al., 2016; WHO, 2020).

Com base na trajetória atual, até 2050, apenas a MDR-TB e a XDR-TB serão responsáveis por 2,5 milhões de mortes por ano (REID et al., 2019). Para minimizar um aumento adicional de MDR-TB e XDR-TB e evitar números catastróficos de mortalidade por TB, é urgente o desenvolvimento de novos agentes anti-TB com novos mecanismos de ação, onde a OMS recomenda que estes possuam redução do período de tratamento, efeito em microrganismos resistentes, ter boa biodisponibilidade em estado de latência e ser acessível em relação ao seu custo (WHO, 2020).

1.4 TB e COVID-19, o encontro das pandemias

A TB acompanha a humanidade há milhares de anos, é a principal causa de morte por um único agente infeccioso e causa cerca de 4 mil óbitos por dia, a OMS tem realizado esforços incansáveis para erradicar a doença com a estratégia “End TB” (WHO, 2020).

Contudo, em dezembro de 2019, casos de pneumonia de origem desconhecida foram identificados em Wuhan na China e pouco tempo depois um novo patógeno foi descoberto e classificado como o vírus SARS-CoV-2, o causador da doença coronavírus 2019 (COVID-19), dando início a uma nova pandemia que assombra a população até os dias atuais (HUANG et al., 2020).

O vírus da família *Coronaviridae* tem sua história conhecida pela a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) que resultou em de 8 mil infecções humanas e causou 774 mortes em 37 países entre 2002 e 2003 (CHAN-YEUNG et al., 2003; PEIRIS; GUAN;

YUEN, 2004) e também pela a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) que foi responsável por 2.494 casos de infecções confirmados e 858 mortes em 2012 (LEE; CHOWELL; JUNG, 2016; LEE et al., 2017).

Entretanto, os números que COVID-19 traz são assustadores e gravemente preocupantes, desde o primeiro relato da doença até a atualização da OMS em 5 de abril de 2021 são mais de 131 milhões de casos detectados e próximo a 3 milhões de mortes relatadas em 223 países (WHO, 2021).

Muito tem sido escrito sobre as interações entre COVID-19 e TB após a OMS declarar o COVID-19 como uma emergência de saúde pública e algumas evidências científicas já foram relatadas (MIGLIORI et al., 2020; MOTTAA, R. CENTISB, L. D'AMBROSIOC, J.-M. GARCÍA-GARCÍAD, D. GOLETTIE, 2020; STOCHINO et al., 2020; TADOLINI et al., 2020). Existem várias semelhanças entre essas duas doenças: ambas são transmitidas através de secreções do trato respiratório (MEYEROWITZ et al., 2021; WU et al., 2020), atacam principalmente os pulmões e apresentam sintomas semelhantes como tosse, febre e dificuldade para respirar (WHO, 2020).

A convergência dessas duas doenças mortais traz preocupações entre as autoridades de saúde e em todo o mundo, especialmente em países onde a TB é endêmica. Acredita-se que o efeito do COVID-19 nos serviços da TB seja catastrófico tendo como consequência o agravamento da epidemia de TB em todo mundo (CORONEL TEIXEIRA; AGUIRRE; PÉREZ BEJARANO, 2021).

Estão ocorrendo impactos econômicos, sociais e na saúde, conseqüentemente levando ao aumento da pobreza e subnutrição que são as principais características de países que já possuem o maior índice de TB. Os fatores que contribuem para essa situação são: redução das unidades de diagnóstico e tratamento da TB, equipes de TB foram realocadas para o COVID-19, transportes de medicamentos foram interrompidos, pessoas com sintomas leves ou doenças crônicas foram desencorajadas a buscar atendimento em unidades de saúde para evitar aglomerações e com o isolamento social as famílias ficaram mais expostas à transmissão domiciliar da TB (WHO, 2020).

No último relatório da OMS foi estimado que os níveis de agravamento desses determinantes podem levar a uma redução de 50% dos casos de TB detectados, essa redução pode causar um aumento de 400 mil mortes por TB em 2020, eliminando todos os esforços e avanço da estratégia “End TB” e regredindo para o número de mortes de 2012 (WHO, 2020).

É inevitável que ambas as pandemias não caminhem juntas, evidências sugerem que COVID-19 e TB tem uma relação sinérgica, potencializando o efeito prejudicial um do outro e

interrompendo os modelos de cuidados de saúde existentes (CRISAN-DABIJA et al., 2020; UDWADIA et al., 2020). Juntas, as duas doenças mostram sua face mais perversa em populações vulneráveis e com comorbidades (DARA et. al, 2020), entretanto todo o caminho percorrido ao longo desses anos com avanço no tratamento, diagnóstico e cuidados com a TB pode contribuir extremamente para os esforços contra a pandemia do COVID-19, bem como todos os estudos e aprendizados enfrentando o COVID-19 pode ser de grande ajuda no desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas contra a TB (MOUSQUER; PERES; FIEGENBAUM, 2021).

Perante ao exposto, todo o caos e agravamento das doenças negligenciadas em sinergismo à mais nova pandemia relatada é de extrema urgência que novos medicamentos mais eficazes sejam descobertos, auxiliando o avanço de novas terapias para TB com medicamentos mais eficientes e assim, conseguirmos alcançar novamente as metas para acabar com essa crise de saúde mundial em meio às pandemias atuais.

1.5 Produtos Naturais

Historicamente, os produtos naturais de plantas e animais foram a fonte de praticamente todas as preparações medicinais e, mais recentemente, estes continuam a ser pesquisados e inclusos em ensaios clínicos e a fornecer pistas para novos compostos contra agentes antimicrobianos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Essa abordagem é enfatizada pelo fato de que 9 das 12 classes de antibióticos atualmente disponíveis são estruturas derivadas de produtos naturais (RODRIGUES FELIX et al., 2017).

Desde a origem do primeiro antibiótico, a penicilina, a busca por produtos naturais com efeitos antibacterianos tiveram seu auge até meados de 1960, chamada época de ouro, em que maioria dos antimicrobianos que temos disponíveis foram descobertos nessa época levando ao rastreamento de muitos microrganismos para potenciais antibióticos, a descoberta de medicamentos a partir de produtos naturais revolucionou a medicina (THOMFORD et al., 2018).

Posteriormente, os antimicrobianos descobertos na época de ouro foram modificados, esse tipo de estratégia pode auxiliar também na síntese de compostos semi-sintéticos (ROSSITER; FLETCHER; WUEST, 2017). Um exemplo dessa estratégia foi utilizado por Lee e colaboradores modificando a espectomicina, produzida por *Streptomyces spectabilis* que possuía baixa atividade contra *M. tuberculosis*, mas poucos efeitos colaterais na espectinamida,

sintetizada a partir da espectomicina e com grande atividade anti *M. tuberculosis* (LEE et al., 2014).

Considerando sua incomparável diversidade química e novos mecanismos de ação, os produtos naturais continuam a desempenhar um papel central em muitos programas de desenvolvimento e pesquisa de drogas. Com o tempo, esses produtos naturais passaram por desenvolvimentos interessantes e significativos em sua capacidade de interagir com numerosos e variados alvos biológicos, e alguns se tornaram os medicamentos mais importantes no sistema de saúde (YUAN et al., 2016).

Como citado anteriormente, os produtos naturais empregam um importante papel na descoberta de novos fármacos, dentre eles, os aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), entre 1981 e 2010, 34% eram produtos naturais ou baseados na estrutura de produtos naturais. As principais classes de antibióticos tiveram produtos naturais como ponto de partida, tais como: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina e rifamicinas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Atualmente, várias plantas utilizadas na alimentação ou como especiarias tem sido amplamente estudadas devido as suas propriedades terapêuticas (CUNHA NETO et al., 2019; HAMPANNAVAR et al., 2016). Como por exemplo o açafrão (*Curcuma longa*), utilizado nesse estudo, pertencente à família *Zingiberaceae* da ordem *Zingiberales*, uma planta perene herbácea nativa do Sudeste Asiático. Os rizomas de *C. longa* são frequentemente utilizados para o tratamento de úlceras gástricas, infecções parasitárias, doenças de pele, inflamações articulares, gripes e resfriados (HEWLINGS; KALMAN, 2017). O extrato dos rizomas dessa planta contém três componentes majoritários: curcumina (60–70%), dimetoxicurcumina (20–27%) e bisdimetoxicurcumina (10–15%), sendo a curcumina a principal responsável pelas propriedades terapêuticas do açafrão (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017; XU et al., 2018).

Das estimadas 250.000 a 500.000 espécies de plantas existentes, apenas uma pequena porção foi cientificamente pesquisada para bioatividades (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013). Portanto, há um grande potencial para descobertas futuras de plantas e outros produtos naturais que podem oferecer um enorme potencial na obtenção de informações úteis sobre novas estruturas químicas e seus novos tipos de ação relacionados ao desenvolvimento de novos medicamentos (YUAN et al., 2016).

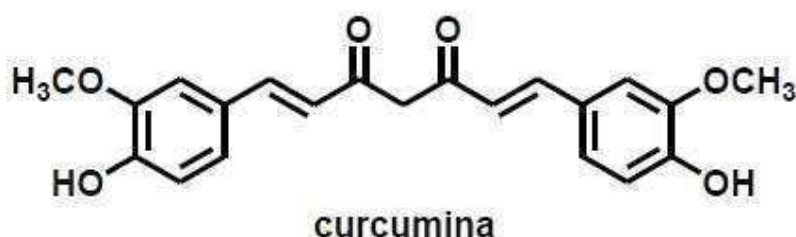
1.6 Curcumina e seus análogos

Nas últimas décadas, tentativas de se entender melhor os mecanismos de ação dos compostos naturais, a fim de os aliar à medicina moderna, tem contribuído para o sucesso de pesquisas sobre a utilização farmacológica de princípios ativos de origem vegetal, colocando os produtos naturais em posição de destaque na área de desenvolvimento de fármacos (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008).

A cúrcuma, nome comum da *Curcuma longa*, é uma especiaria indiana derivada dos rizomas da planta e tem uma longa história de uso na medicina ayurvédica, sistema medicinal característico da Índia Antiga, sendo utilizado pelas suas ações digestivas, imunizante, antialérgico, cicatrizante, antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante, entre outras bioatividades (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017; STANIĆ, 2017; XU et al., 2018).

Sua descoberta aconteceu dois séculos atrás, quando Vogel e Pelletier relataram o isolamento de “matéria corante amarela” dos rizomas da *Curcuma longa*. Também conhecida como açafrão, e a chamaram de curcumina (VOGEL; PELLETIER, 1815). Apenas em 1910, Milobedzka e Lampe identificaram sua estrutura química, representada na Figura 2, e 3 anos mais tarde, em 1913, os mesmos pesquisadores conseguiram sintetizar o composto (LAMPE; MILOBEDZKA, 1913) (GUPTA et al., 2012).

Figura 2. Estrutura da curcumina. Fonte: Gupta et. al. 2012



Apesar da curcumina ter sido consumida como condimento e usada como cura para algumas doenças por milhares de anos nos países asiáticos, suas características biológicas só foram cientificamente identificadas em meados do século XX (GUPTA et al., 2012). Schraufstatter e colaboradores relataram que a curcumina é um composto biologicamente ativo que possui propriedades antibacterianas. Os autores descobriram que a curcumina foi ativa contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Trichophyton gypseum* (SCHRAUFSTÄTTER; BERNT, 1949), entretanto, apesar das descobertas, foram publicados

poucos artigos científicos sobre a curcumina durante as duas décadas seguintes (GUPTA et al., 2012).

Na década de 1970, a curcumina tornou-se alvo de investigações científicas e diversas de suas características foram relatadas, como a redução do colesterol (PATIL; SRINIVASAN, 1971), seu efeito antidiabético (SRINIVASAN, 1972), anti-inflamatório, antioxidante e mais tarde na década de 1980 foi estudado seus efeitos anticancerígenos em modelos *in vitro* e *in vivo* (SRIMAL; DHAWAN, 1973).

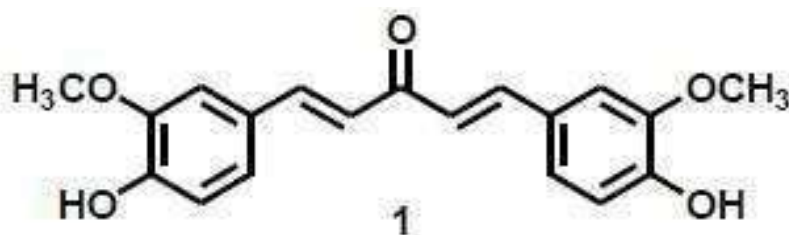
O efeito antitumoral da curcumina foi o mais estudado nos últimos anos, inclusive com a síntese de análogos estruturais com implicações em câncer cervical (SRIMAL; DHAWAN, 1973), câncer de cólon (DEVASENA et al., 2003), entre outros trabalhos (KIM et al., 1998; OHORI et al., 2006).

Apesar de demonstrar diversas bioatividades, a curcumina apresenta algumas limitações que impedem o seu uso como agente terapêutico, como: baixa biodisponibilidade, baixa solubilidade em água e instabilidade elevada em condições fisiológicas, sofrendo degradação prematura por administração oral (HEWLINGS; KALMAN, 2017; TEOW et al., 2016; XU et al., 2018). Descobriu-se que essas instabilidades farmacocinéticas estão relacionadas principalmente à subunidade β -dicetônica de sua estrutura (HAMPANNAVAR et al., 2016).

O desenvolvimento de análogos estruturais, que apresentam a substituição dessa subunidade β -dicetônica por um grupo monocarbonílico, é uma das estratégias utilizadas para superar as limitações da curcumina. Foi demonstrado em estudos farmacocinéticos que esses análogos são mais ativos e demonstram maior estabilidade *in vivo* do que a curcumina (SUBHEDAR et al., 2017).

No trabalho de Morão e colaboradores em 2018 foi analisada a atividade antibacteriana de um análogo 1 simplificado da curcumina, apresentado na Figura 3, no qual um grupo monocarbonílico substituiu a subunidade β -dicetônica, preservando as duplas ligações bem como as subunidades guaiacol. Essa substância foi ativa contra *X. citri*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* e *B. subtilis* com valores de porcentagem de inibição de crescimento que variaram de 59 a 93% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstraram que o análogo 1 exerce sua atividade antibacteriana por meio da permeabilização da membrana bacteriana e ruptura do septo divisional bacteriano (MORÃO et al., 2018).

Figura 3. Estrutura do análogo monocetônico de curcumina 1. Fonte: Morão et. al, 2018



Além da subunidade β -dicetônica, os anéis aromáticos são outra subunidade estrutural da curcumina que pode ser alvo de modificação para o planejamento de análogos (BALDWIN et al., 2015). No trabalho de Ayusso em 2019, foi planejado uma série de análogos de curcumina inéditos na literatura, com a subunidade β -dicetônica substituída por um grupo monocarbonílico, esta constituiu-se de análogos com o anel B substituído por grupos lipofílicos e hidrofílicos (Figura 4). Também foi realizado o estudo *in silico*, as previsões indicaram que todos os análogos exibiram boa semelhança com drogas orais e propriedades farmacocinéticas, foi determinado o coeficiente de partição n-octanol/água ($\log P_{o/a}$), bem como o peso molecular (MW) desses compostos e a porcentagem de absorção intestinal humana (HIA) (Tabela 1), tornando-os aptos segundo as regras de Lipinski e Veber para uma boa absorção de medicamentos com administração oral (LIPINSKI, 2004; VEBER et al., 2002), entre outros estudos. Os análogos passaram por uma etapa inicial de screening pelo método de REMA (PALOMINO et al., 2002 com modificações), onde foi avaliada a capacidade dos compostos em inibir a atividade de *M. tuberculosis*. Os compostos apresentaram um valor de CIM < 10 μ M, tornando-os aptos para a avaliação da citotoxicidade (AYUSSO, 2019).

Figura 4. Planejamento dos análogos monocetônicos de curcumina. Fonte: Ayusso, 2019

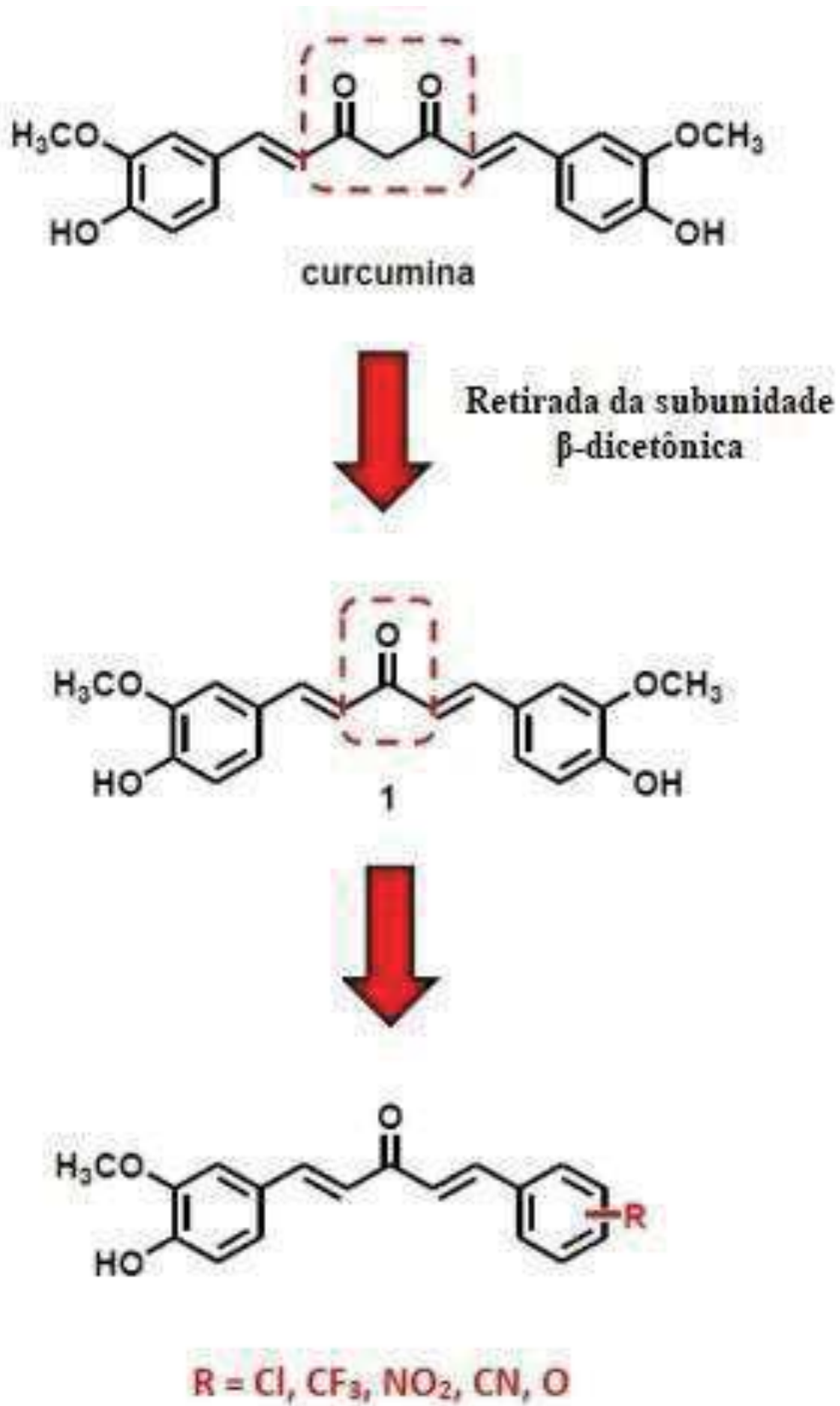
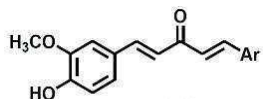


Tabela 1. Estrutura, peso molecular (MW), coeficiente de partição n-octanol/água ($\log P_{o/a}$) e porcentagem de absorção intestinal humana (HIA) dos análogos monocetônicos de curcumina.

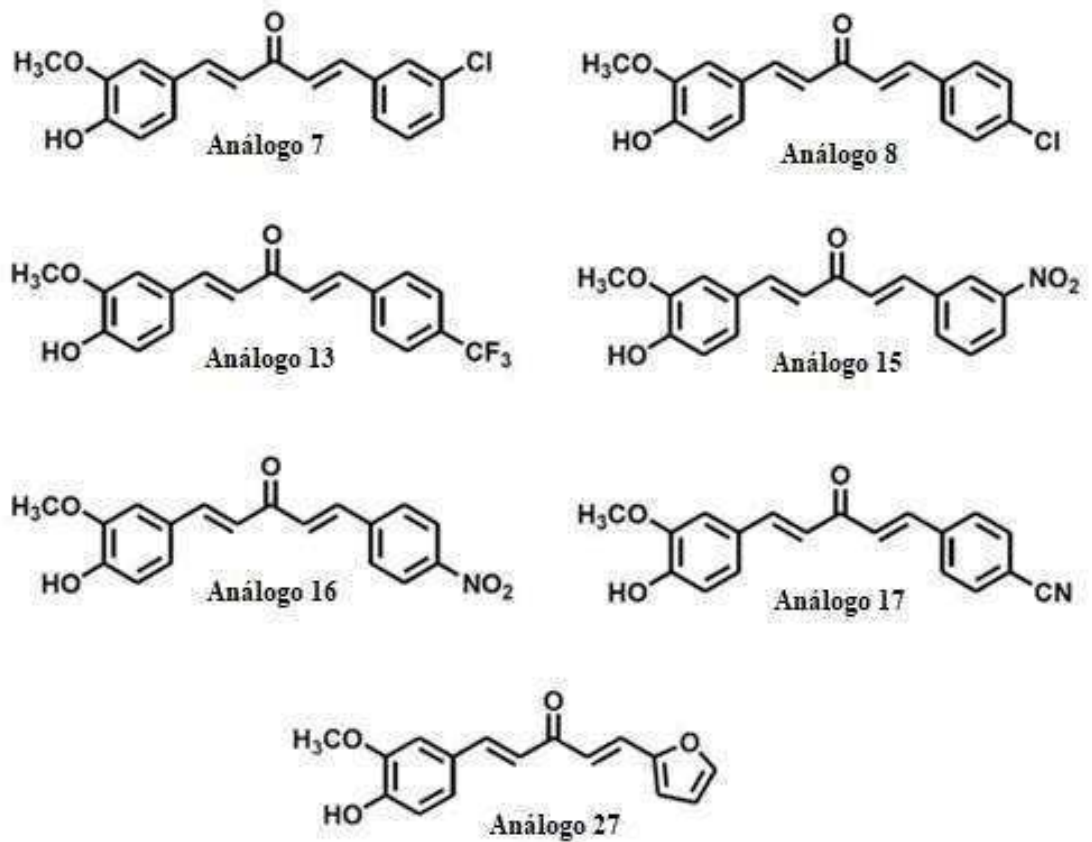
Fonte: Ayusso, 2019



Análogo	Ar	MW	$\log P_{o/a}$	HIA (%)
7	3-clorofenil	314,8	3,9	96,2
8	4-clorofenil	314,3	3,8	96,2
13	4-trifluorometilfenil	348,3	4,0	95,9
15	3-nitrofenil	325,3	3,0	89,9
16	4-nitrofenil	325,3	3,0	89,9
17	4-nitrilfenil	305,3	2,4	96,2
27	2-furanil	270,3	2,4	95,7

A citotoxicidade foi realizada em 3 tipos de células (MRC-5, J774.A1 e HEPG2) e após essa etapa foi calculado o Índice de Seletividade (IS) que é encontrado pela razão entre IC_{50} e CIM_{90} e representa o quanto um composto é mais seletivo em eliminar o microrganismo do que causar danos às células eucarióticas. Nesse trabalho foram utilizados 7 análogos monocetônicos de curcumina inéditos na literatura, representados na Figura 5, que apresentaram valor de $IS > 10$, tornando-os candidatos seletivos e promissores para mais estudo frente *M. tuberculosis*, os quais foram sintetizados e gentilmente fornecidos pela aluna Gabriela Miranda Ayusso e seu orientador Professor Doutor Luis Octávio Regasini, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - São José do Rio Preto.

Figura 5. Análogos monocetônicos de curcumina.



Diante do apresentado e sobretudo da emergência de cepas resistentes, o desenvolvimento urgente de novos medicamentos anti-TB eficazes, na busca por novas opções de terapias com menor toxicidade, menor tempo de tratamento e baixo custo, os produtos naturais estão sendo amplamente estudados, o que traz um grande potencial para descobertas futuras relacionadas ao desenvolvimento de novos medicamentos.

4. Conclusion

The monocarbonyl analogues of curcumin showed great potential against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and three of the four clinical isolates tested, including an XDR-TB, suggesting that the mechanism of action of these analogues probably differs from the drugs tested, rifampicin and isoniazid.

In general, monocarbonyl analogues of curcumin demonstrated less cytotoxicity and greater selectivity for macrophages than pulmonary fibroblasts and hepatocytes from human hepatocellular carcinoma.

All analogues studied showed inhibition of *M. tuberculosis* intramacrophage. Analogues 7, 13, 16, 17 and 27, which obtained excellent results, showed higher bacterial growth at the lowest concentration (1xCIM) and lower bacterial growth at the highest concentration (10xCIM).

The monocarbonyl analogues of curcumin can be classified as substances with a narrow spectrum of activity, given their activities against *M. tuberculosis* and other tested bacterial strains. No analogue tested showed a MIC₉₀ against Gram-negative and Gram-positive bacteria, making it selective in inhibiting *M. tuberculosis*.

Regarding the acute toxicity, a percentage of survival was observed in all monocarbonyl analogues of curcumin from 90 to 100%, including the RFP that was used as a drug in the control group and DMSO as a vehicle group. Thus, these analogues did not demonstrate toxicity *in vivo* in *G. mellonella*, indicating its potential safe use in clinical studies.

Our study followed up on new discoveries regarding the evaluation of the anti-TB activity of monocarbonyl analogues of curcumin unprecedented in the literature, demonstrating that they are promising candidates for drugs against TB.

Acknowledgments

The author gratefully acknowledge financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANKRAH, A. O. et al. Tuberculosis. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 48, n. 2, p. 108–130, 2018.

ARPAGAUS, A.; WEISSER, M. CME: Extrapulmonary tuberculosis. **Praxis**, v. 108, n. 15, p. 1019–1026, 2019.

AYUSSO, G. M. **Síntese e Avaliação de Análogos Monocetônicos de Curcumina como Potenciais Agentes contra a Tuberculose**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, p. 171. 2019.

BALDWIN, P. R. et al. Monocarbonyl analogs of curcumin inhibit growth of antibiotic sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 693–699, 2015.

BATES, J. H.; STEAD, W. W. The history of tuberculosis as a global epidemic. **The Medical clinics of North America**, v. 77, n. 6, p. 1205–1217, 1993.

CHAN-YEUNG, M. et al. SARS: epidemiology. **Respirology**, v. 8, p. S9–S14, 2003.

CHAUDHARI, K. et al. *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.

CORONEL TEIXEIRA, R.; AGUIRRE, S.; PÉREZ BEJARANO, D. Thinking about tuberculosis in times of COVID-19. **Journal of Internal Medicine**, v. 289, n. 4, p. 589–590, 2021.

CRISAN-DABIJA, R. et al. Tuberculosis and COVID-19 in 2020: Lessons from the past viral outbreaks and possible future outcomes. **Canadian Respiratory Journal**, v. 2020, p. 10, 2020.

CUNHA NETO, F. et al. Curcuminoids from *Curcuma Longa*: New adjuvants for the treatment of crohn’s disease and ulcerative colitis? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 13, p. 2136–2143, 2019.

DAFFÉ, M.; ETIENNE, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications

for pathogenicity. **Tubercle and Lung Disease**, v. 79, n. 3, p. 153–169, 1999.

DANIEL, T. M. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 11, p. 1181–1182, 2005.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–1870, 2006.

DARA, M. et al. New diseases and old threats: lessons from tuberculosis for the COVID-19 response. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, p. 544–545, 2020.

DEELDER, W. et al. Machine learning predicts accurately *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance from whole genome sequencing data. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. SEP, 2019.

DEVASENA, T. et al. Anticarcinogenic effect of bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione a curcumin analog on DMH-induced colon cancer model. **Pharmacological Research**, v. 47, n. 2, p. 133–140, 2003.

DIEDRICH, C. R.; O'HERN, J.; WILKINSON, R. J. HIV-1 and the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma: A systematic review and meta-analysis. **Tuberculosis**, v. 98, n. March, p. 62–76, 2016.

DOOKIE, N. et al. 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.

GILL, W. P. et al. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Medicine**, v. 15, n. 2, p. 211–214, 2009.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787–809, 2008.

GORDON, S. V.; PARISH, T. Microbe profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 4, p. 437–439, 2018.

GUPTA, S. C. et al. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 3, p. 283–299, 2012.

GUTIERREZ, M. C. et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 1, p. 0055–0061, 2005.

HAMPANNAVAR, G. A. et al. An appraisal on recent medicinal perspective of curcumin degradant: Dehydrozingerone (DZG). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 501–520, 2016.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HORSBURGH, C. R.; BARRY, C. E.; LANGE, C. Treatment of Tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, p. 2149–2160, 2015.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

IRWIN, S. M. et al. Presence of multiple lesion types with vastly different microenvironments in C3HeB/FeJ mice following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Disease Models and Mechanisms**, v. 8, n. 6, p. 591–602, 2015.

KIM, J. M. et al. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p. 81–85, 1998.

KIRAN, D. et al. Host-directed therapy targeting the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma: a review. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 167–183, 2016.

KOCAAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889–2895, 2017.

KOCH, A.; MIZRAHI, V. *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 555–556, 2018.

LAMPE, V.; MILOBEDZKA, J. Studien uber Curcumin. **Ber. Deut. Chem. Ges.**, p. 46, 1913.

LEE, H. M.; GIGUERE, P. M.; ROTH, B. L. DREADDs: Novel tools for drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p. 469–473, 2014.

LEE, H. S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* induces connective tissue growth factor expression through the TLR2-JNK-AP-1 pathway in human lung fibroblasts. **FASEB Journal**, v. 33, n. 11, p. 12554–12564, 2019.

LEE, J.; CHOWELL, G.; JUNG, E. A dynamic compartmental model for the Middle East respiratory syndrome outbreak in the Republic of Korea: A retrospective analysis on control interventions and superspreading events. **Journal of Theoretical Biology journal**, v. 408, p. 118–126, 2016.

LEE, J. Y. et al. The clinical and virological features of the first imported case causing MERS-CoV outbreak in South Korea, 2015. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

LEE, R. E. et al. Spectinamides: A new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux. **Nature Medicine**, v. 20, n. 2, p. 152–158, 2014.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

MAHAJAN, R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.

MATTEELLI, A.; ROGGI, A.; CARVALHO, A. C. C. Extensively drug-resistant tuberculosis: Epidemiology and management. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 111–118, 2014.

MEYEROWITZ, E. A. et al. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. **Annals of internal medicine**, v. 174, n. 1, p. 69–79, 2021.

MIGLIORI, G. B. et al. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: The new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 3, p. 423–427, 2007.

MIGLIORI, G. B. et al. Worldwide Effects of Coronavirus Disease Pandemic on Tuberculosis Services, January–April 2020. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 11, p. 2709–2712,

2020.

MORÃO, L. G. et al. A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 4, p. 1–12, 2018.

MOTTAA, R. CENTISB, L. D'AMBROSIO, J.-M. GARCÍA-GARCÍA, D. GOLETTIE, G. G. Tuberculosis, COVID-19 and migrants: Preliminary analysis of deaths occurring in 69 patients from two cohorts. **Pulmonology Journal**, v. 26, n. January, p. 233–240, 2020.

MOUSQUER, G. T.; PERES, A.; FIEGENBAUM, M. Pathology of TB/COVID-19 Co-Infection: The phantom menace. **Tuberculosis**, v. 126, n. July 2020, p. 102020, 2021.

NACHIAPPAN, A. C. et al. Pulmonary tuberculosis: Role of radiology in diagnosis and management. **Radiographics**, v. 37, n. 1, p. 52–72, 2017.

NASIRI, M. J. et al. New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. APR, 2017.

NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 584–592, 2013.

OHORI, H. et al. Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 10, p. 2563–2571, 2006.

ORME, I. M.; BASARABA, R. J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 601–609, 2014.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PANG, Y. et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis among inpatients, China, 2008–2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 457–464, 2019.

PATIL, T. N.; SRINIVASAN, M. Hypocholesteremic effect of curcumin in induced

hypercholesteremic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 9, n. 2, p. 167–169, 1971.

PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. Severe acute respiratory syndrome. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12S, p. S88–S97, 2004.

REID, M. J. A. et al. Building a tuberculosis-free world: The Lancet Commission on tuberculosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10178, p. 1331–1384, 2019.

RODRIGUES FELIX, C. et al. Selective killing of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by marine natural products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, 2017.

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

ROSSITER, S. E.; FLETCHER, M. H.; WUEST, W. M. Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 19, p. 12415–12474, 2017.

SRIMAL, R. C.; DHAWAN, B. N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a nonsteroidal anti-inflammatory agent. **J Pharm Pharmacol**, v. 25, p. 447–52, 1973.

SRINIVASAN, M. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. **Indian J Med Sci**, v. 26, p. 269–70, 1972.

STOCHINO, C. et al. Clinical characteristics of COVID-19 and active tuberculosis co-infection in an Italian reference hospital. **European Respiratory Journal**, v. 56, n. 1, 2020.

SUBHEDAR, D. D. et al. Quinolidene based monocarbonyl curcumin analogues as promising antimycobacterial agents: Synthesis and molecular docking study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 4, p. 922–928, 2017.

TADOLINI, M. et al. Active tuberculosis, sequelae and COVID-19 co-infection: First cohort of 49 cases. **European Respiratory Journal**, v. 56, n. 1, 2020.

TANG, P.; JOHNSTON, J. Treatment of Latent Tuberculosis Infection. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, p. 371–379, 2017.

TEOW, S. Y. et al. Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2016, 2016.

THOMFORD, N. E. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018.

TURNER, R. D.; BOTHAMLEY, G. H. Cough and the transmission of tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 9, p. 1367–1372, 2015.

UDWADIA, Z. F. et al. COVID-19 -Tuberculosis interactions: When dark forces collide. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 67, p. 155–162, 2020.

VASAVA, M. S. et al. Drug development against tuberculosis: Past, present and future. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 64, n. 4, p. 252–275, 2017.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

VOGEL, H.; PELLETIER, J. Curcumin–biological and medicinal properties. **Journal de Pharmacie**, v. 1, p. 289, 1815.

World Health Organization (2018). **Global tuberculosis report 2018**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf>>.

World Health Organization (2019). **Global tuberculosis report 2019**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf>>.

World Health Organization (2020). **Global tuberculosis report 2020**. Disponível em : <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>>.

World Health Organization (2021). Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Acessado em: 6 de abril de 2021

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020.

XAVIER, A. S.; LAKSHMANAN, M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 5, n. 3, p. 222–224, 2014.

XU, X. Y. et al. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin:

Current progress, challenges, and perspectives. **Nutrients**, v. 10, n. 10, 2018.

YUAN, H. et al. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

ZIGNOL, M. et al. Twenty Years of Global Surveillance of Antituberculosis-Drug Resistance. p. 1081–1089, 2016.