

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

DÉBORA LEITE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E BUSCA DO MECANISMO
DE AÇÃO DE HIDRAZONAS FRENTE AO *Mycobacterium
tuberculosis***

ARARAQUARA - SP
2018

Débora Leite Campos

“Avaliação da atividade e busca do mecanismo de ação de hidrazonas frente ao *Mycobacterium tuberculosis*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas a 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
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C198a Campos, Débora Leite
Avaliação da atividade e busca do mecanismo de ação de hidrazonas frente ao
Mycobacterium tuberculosis / Débora Leite Campos. – Araraquara, 2018.
61 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 concentração Bacteriologia.

Orientador: Rogério Fernando Pavan.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Hidrazonas. 3. Tuberculose. I. Pavan, Fernando
Rogério, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

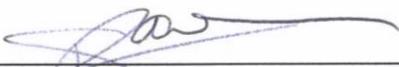
DÉBORA LEITE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E BUSCA DO MECANISMO DE AÇÃO DE HIDRAZONAS FRENTE
AO *Mycobacterium tuberculosis***

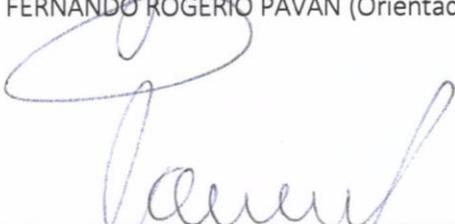
Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre(a) em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA.

Araraquara, 29 de junho de 2018.

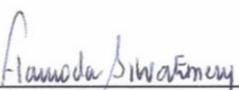
BANCA EXAMINADORA



FERNANDO ROGÉRIO PAVAN (Orientador)



JEAN LEANDRO DOS SANTOS



FLAVIO DA SILVA EMERY

Dedico este trabalho de Dissertação ao meu
filho Theo, por me mostrar que sou muito mais
forte do que poderia imaginar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser minha força e fortaleza e por nos deixar a seguinte mensagem: “Jesus olhou para os discípulos e disse: para os homens isso é impossível, mas para Deus tudo é possível. Eis que eu estou com vocês todos os dias, até o fim do mundo” (Mateus 19,26;28,20).

Agradeço à minha família, por ser minha base e inspiração; aos meus amigos de longa data, por tornarem a jornada mais leve e ao meu amor, por dividir cada momento comigo.

Agradeço aos amigos de laboratório que me auxiliaram na execução dos experimentos, na análise de resultados, na escrita do trabalho e que compartilharam comigo tantos momentos de alegria, dificuldade e sucesso.

Agradeço à CAPES, pela bolsa concedida para execução deste trabalho.

Capítulo I

RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que possui como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* e que levou ao óbito, em 2016, 1,3 milhões de pessoas ao redor do mundo. Seu tratamento, recomendado pela Organização Mundial da Saúde, constitui-se da utilização de quatro antimicrobianos por, no mínimo, seis meses. Este esquema de tratamento apresenta variados efeitos adversos que levam o paciente a abandonar a terapia logo no início do desaparecimento dos sintomas, levando ao surgimento de cepas resistentes. As infecções provocadas por cepas resistentes aos fármacos vêm aumentando com o passar dos anos, o que se tornou um dos maiores problemas para o controle da doença. Dessa forma, é essencial a busca por novos candidatos a fármacos, com o objetivo de diminuir o tempo de tratamento e a disseminação de cepas resistentes. Em um estudo prévio do grupo, foram sintetizados compostos da classe das hidrazonas que mostraram interessante atividade contra o *M. tuberculosis*. Nesse trabalho, aprofundamos o estudo de quatro dessas moléculas, numeradas como 14, 15, 16 e 18. Os resultados obtidos indicaram a molécula 14 (C₁₆H₁₅O₂N₃) como a mais promissora, apresentando o menor valor de concentração inibitória mínima (CIM₉₀) de 0,35 µg/mL frente a cepa padrão sensível aos antibióticos em estado ativo de replicação e 1,78 µg/mL quando em estado não-replicante. Além disso, apresentou um perfil bactericida e atividade intramacrofágica. Frente às células eucarióticas, a hidrazona 14 não apresentou toxicidade, com índices de citotoxicidade (IC₅₀) maiores que 100 µg/mL em quase todos os tempos de tratamento e altos índices de seletividade (IS), além de apresentar um estreito espectro de atividade. Assim, a hidrazona 14 foi selecionada como o composto líder, tendo sido levada para os experimentos de busca de mecanismo de ação. Nesse caminho, utilizamos técnicas que poderiam demonstrar inibição de síntese de ácidos micólicos, presentes na parede celular e/ou ação na inibição das bombas de efluxo presente no envelope celular bacteriano. Os resultados obtidos sugerem que nenhum desses mecanismos fenotípicos é o meio pelo qual o fármaco age no microrganismo. Dessa forma, novos ensaios serão necessários para desvendar o mecanismo de ação desempenhado por esta hidrazona.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, hidrazonas, tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. In 2016, was the cause of death of 1.3 million people around the world. Its treatment, recommended by the World Health Organization, consists of the use of four antibiotics for at least six months. This treatment regimen has several adverse effects that lead the patient to abandon the therapy at the beginning of the disappearance of the symptoms, which leads to the emergence of resistant strains. Infections caused by drug-resistant strains have been increasing over the years, which has become one of the major problems in controlling the disease. Because of that, the search for new compounds occurs with the objective of reducing the time of treatment and inhibiting the growth of resistant strains. In a previous study of the group, compounds of the class of hydrazones that showed interesting activity against *M. tuberculosis* were synthesized. In this work, we investigated four of these molecules, numbered as 14, 15, 16 and 18. The results indicated that hydrazone 14 (C₁₆H₁₅O₂N₃) was the most promising molecule because it presented the lowest minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of 0.35 µg/mL against H₃₇Rv strain, in active replication state and 1.78 µg/mL when in non-replicating state. In addition, it presented a bactericidal and intramacrophagic activity. In the cytotoxicity assays, hydrazone 14 presented no cytotoxicity (IC₅₀) in all treatment times and high selectivity index (IS), as well as presenting a narrow spectrum of activity and, therefore, presents itself as the most promising molecule. Therefore, this hydrazone was investigated about its mechanism of action. Therefore, it was used techniques that could demonstrate the inhibition of the synthesis of mycolic acids presents in the cell wall and / or action in the inhibition of the efflux pumps presents in the bacterial cell envelope. The obtained results showed that this hydrazone act by none of this mechanisms. Thus, new experiments are necessary to discover the mechanism of action by this molecule.

Key-works: *Mycobacterium tuberculosis*, hydrazones, tuberculosis.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Número de novos casos estimados em 2016.....	13
Figura 2. Imagem esquemática representando a estrutura da membrana e parede celular micobacteriana.....	14
Figura 3. Estrutura química dos ácidos micólicos presentes na parede celular do <i>M. tuberculosis</i>	15
Figura 4. Representação esquemática da transmissão e patogenia da TB.....	16
Figura 5. Estrutura e massa molecular dos quatro antibióticos utilizados no tratamento da TB.....	17
Figura 6. Etapas de análise das hidrazonas.....	23
Figura 7. Curvas de crescimento bacteriano em condições de oxigenação (A) e de hipóxia (B). As flechas indicam a mudança de metabolismo para NPR-1 e NPR-2 (estados não-replicantes 1 e 2).....	26
Figura 8. Placa de cultivo exemplificando as placas de lise formadas por fagos em seu ciclo lítico.....	31
Figura 9. Mecanismo de ação da isoniazida. Metabolização por KatG e inibição enzimática de InhA.....	34
Gráfico 1. Índice de citotoxicidade (IC ₅₀) das moléculas hidrazonas e isoniazida (INH) frente linhagem celular macrofágica, J774A.1. Concentração máxima testada de 100 µg/mL. Análise estatística por Prisma 5.0: Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. *= diferença estatística significativa com relação ao tratamento com INH no mesmo tempo de tratamento.....	36
Gráfico 2. Índice de citotoxicidade (IC ₅₀) das moléculas hidrazonas e isoniazida (INH) frente linhagem celular de fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5). Concentração máxima testada de 100 µg/mL. Análise estatística por Prisma 5.0: Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. *= diferença estatística significativa com relação ao tratamento com INH no mesmo tempo de tratamento.....	37
Gráfico 3. Cinética bacteriana da hidrazona 14 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia (p<0,05). Análise estatística: Prisma 5.0, one-way ANOVA com pós-teste <i>Newman-keuls</i> . Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independentes.....	40
Gráfico 4. Cinética bacteriana da hidrazona 15 e controles de crescimento bacteriano e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente	

diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independentes.....41

Gráfico 5. Cinética bacteriana da hidrazona 16 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$); b= contagem bacteriana estatisticamente diferente da INH no mesmo dia ($p < 0,05$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independente.....42

Gráfico 6. Cinética bacteriana da hidrazona 18 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independentes.....43

Gráfico 7. Atividade intramacrofágica da hidrazona 14 ($CIM_{90} = 0,35 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.....44

Gráfico 8. Atividade intramacrofágica da hidrazona 14 em maiores concentrações ($CIM_{90} = 0,35 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.....45

Gráfico 9. Atividade intramacrofágica da hidrazona 16 ($CIM_{90} = 1,82 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.....46

Gráfico 10. Atividade intramacrofágica da hidrazona 18 ($CIM_{90} = 5,30 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.....47

Figura 10. CCD dos ácidos micólicos extraídos após tratamento. Da esquerda para dii padrão, RFP, INH, ETA, ETH, controle não tratado e hidrazona 14.....48

Gráfico 11. Gráfico da fluorescência relativa do brometo de etídio com relação ao tempo para avaliação da atividade com relação a inibição de bombas de efluxo. *= momento em que se inicia a diferença estatística significativa do controle e da hidrazona 14 com relação ao verapamil (18min). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de triplicata técnica.....50

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Hidrazonas derivadas da molécula de INH: nome, estrutura e massa molecular (MM), valores de LogP, concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente *M. tuberculosis* H₃₇Rv, índice de citotoxicidade (IC) frente células macrofágicas J774A.1 e índice de seletividade (IS).....21
- Tabela 2.** Resultados da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente cepa sensível de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em estado metabólico ativo (REMA) e não-replicante (LORA). Valores apresentados como média e desvio padrão (M ± DP) de três ensaios independentes em µg/mL e µM.....32
- Tabela 3.** Resultados de índice de seletividade (IS) obtidos para as hidrazonas e isoniazida nos testes de citotoxicidade em 24h, 48h e 72h frente as linhagens celulares de macrófagos murinos (J774A.1) e fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5).....38
- Tabela 4.** Resultados da atividade frente diferentes cepas bacterianas Gram positivas e negativas, cálculo da concentração inibitória de 90% (CIM₉₀). Valores apresentados como média (M) e desvio padrão (DP) de três ensaios independentes em µg/mL.....39
- Tabela 5.** Resumo geral da atividade das hidrazonas em todos testes executados.....47
- Tabela 6.** Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas de *M. smegmatis* mc²155 (ATCC 700084). Valores apresentados como média (M) ± desvio padrão (DP) de três ensaios independentes.....51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. TUBERCULOSE.....	13
1.2. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	14
1.3. TRANSMISSÃO E PATOGENIA.....	15
1.4. TRATAMENTO.....	17
1.5. NOVOS FÁRMACOS.....	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL.....	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. SÍNTESE DAS HIDRAZONAS.....	23
3.2. CEPAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	24
3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM ₉₀) FRENTE AO <i>M. TUBERCULOSIS</i> EM ESTADO METABÓLICO ATIVO.....	24
3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM ₉₀) FRENTE AO <i>M. TUBERCULOSIS</i> EM ESTADO NÃO-REPLICANTE, EM HIPÓXIA.....	25
3.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CITOTOXICIDADE (IC ₅₀) FRENTE CÉLULAS MACRÓFÁGICAS (J774A.1) E FIBROBLASTOS PULMONARES (MRC-5).....	27
3.6. CINÉTICA BACTERIANA.....	27
3.7. ATIVIDADE INTRAMACROFÁGICA.....	28
3.8. ESPECTRO DE ATIVIDADE.....	28
3.9. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÁCIDOS MICÓLICOS - CCD.....	29
3.10. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO.....	30
3.11. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE PROTEÍNAS.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM ₉₀) FRENTE AO <i>M. TUBERCULOSIS</i> EM ESTADO METABÓLICO ATIVO E NÃO-REPLICANTE.....	32
4.2. RESULTADOS DE ÍNDICE DE CITOTOXICIDADE (IC ₅₀) FRENTE CÉLULAS MACROFÁGICAS E FIBROBLASTOS PULMONARES EM 24, 48 E 72 HORAS.....	35
4.3. ESPECTRO DE ATIVIDADE.....	38
4.4. CINÉTICA BACTERIANA.....	39
4.5. ATIVIDADE INTRAMACROFÁGICA.....	44
4.6. DETERMINAÇÃO DO COMPOSTO LÍDER.....	47
4.7. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÁCIDOS MICÓLICOS – CCD.....	48
4.8. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO.....	49
4.9. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS.....	50
5. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença crônica, provocada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que possui como foco principal de infecção o tecido pulmonar, mas que pode se disseminar pelo organismo e se apresentar em outros órgãos, na chamada tuberculose extrapulmonar. Seu diagnóstico pode ser obtido por meio de cultura oriunda de amostra obtida do paciente além de testes imunológicos e genéticos (LEE, 2015).

Essa infecção, causada por um único agente infeccioso, é hoje a doença que mais mata no mundo, superando a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Em números, excluindo-se os casos de morte de pacientes co-infectados, foram relatados 1,3 milhões de mortes em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Na Figura 2, é possível observar a incidência de novos casos de TB ao redor do mundo em 2016. Podemos notar que as maiores taxas aparecem em países do continente africano e asiático, sendo que Índia, Indonésia, China, Filipinas e Paquistão estão entre os países que representam 53% do total de novos casos de TB em 2016, sendo que ao redor de todo mundo foram contabilizados 6,3 milhões de novos casos dos quais, estatisticamente, 16% irão a óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

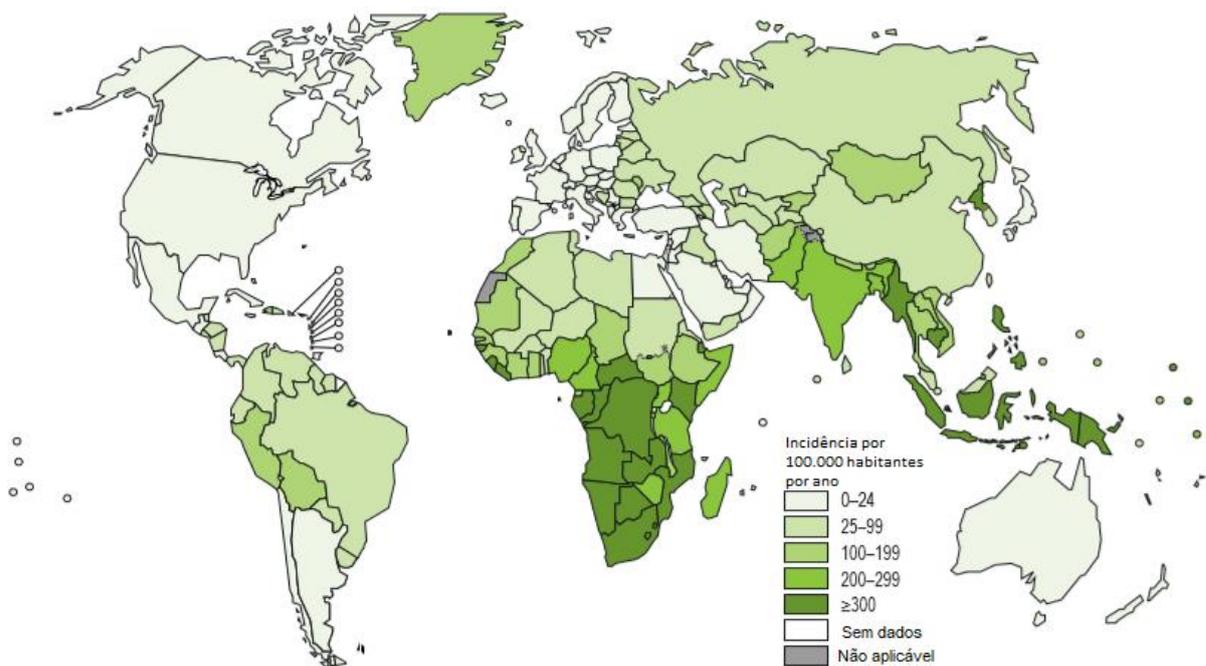


Figura 1. Número de novos casos estimados em 2016. Fonte: WHO, 2017.

1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Identificado por Robert Koch em 1882, o bacilo *M. tuberculosis* é o principal agente causador da TB. É um patógeno intracelular facultativo que possui a capacidade de sobreviver e se multiplicar dentro das células macrofágicas, podendo assim evadir da ação imunológica (DAFFÉ; ETIENNE, 1999; MIGLIORI et al., 2007).

De crescimento lento, com tempo de geração de aproximadamente 20 horas *in vitro* e *in vivo*, não apresenta características de membrana que a classifique como uma bactéria Gram-positiva ou negativa e é corada pela técnica de *Ziehl-Neelsen* por ser um bacilo álcool-ácido resistente (VASAVA et al., 2009; KOCH; MIZRAHI, 2018).

Essa particularidade para o método de coloração ocorre devido, principalmente, aos lipídeos de sua parede que lhes confere uma característica de baixa permeabilidade a compostos hidrofílicos além de serem essenciais para sua patogênese (JANKUTE et al., 2015; QUIGLEY et al., 2017).

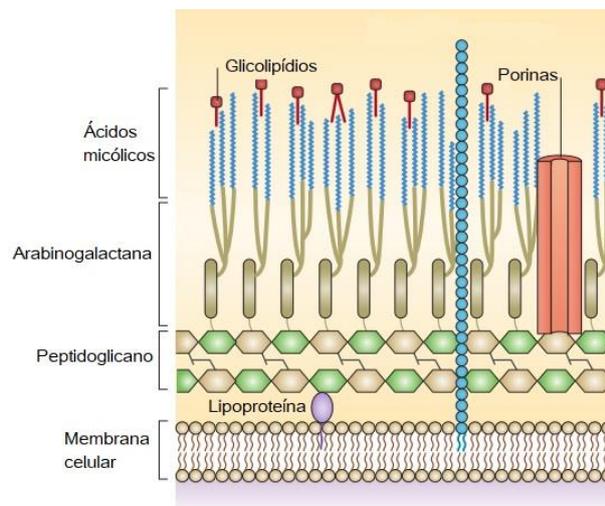


Figura 2. Imagem esquemática representando a estrutura da membrana e parede celular micobacteriana. (BROWN et al., 2015).

Como pôde-se observar na Figura 2, sua membrana e parede celular se apresentam em estrutura diferente das demais bactérias, principalmente pela presença dos ácidos micólicos e glicolipídeos na região externa (QUIGLEY et al., 2017).

Esses ácidos micólicos se ligam à camada de arabinogalactano e esta ao peptidoglicano, que é associado à membrana por meio das lipoproteínas. No *M. tuberculosis*, são encontrados três diferentes tipos de ácidos micólicos, os alfa, ceto e metoxi-ácidos micólicos, apresentados na Figura 3 (BROWN et al., 2015; JANKUTE et al., 2015).

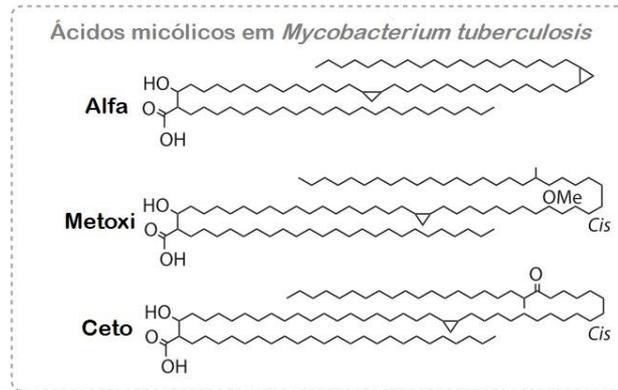


Figura 3. Estrutura química dos ácidos micólicos presentes na parede celular do *M. tuberculosis* (JANKUTE et al., 2015).

Vários antimicrobianos utilizados na terapia possuem como mecanismo de ação a inibição da síntese de alguma porção da membrana ou parede celular micobacteriana, o que demonstra sua grande importância. Dentre os mais utilizados estão a isoniazida (INH), o etambutol (ETH) e a etionamida (ETA) (BELISLE et al., 1997; JANKUTE et al., 2015).

Intrínseco ao bacilo é a resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, por apresentar em sua parede as enzimas β -lactamases, responsáveis pela inativação dessas estruturas. Não apresenta mecanismos de transferência genética horizontal e nenhum plasmídeo é conhecido (DAFFÉ; ETIENNE, 1999; KOCH; MIZRAHI, 2018).

Outro mecanismo de resistência dessas bactérias e presente em sua parede são as bombas de efluxo. Nos últimos anos foram identificadas bombas de efluxo em *M. tuberculosis* pertencentes às superfamílias ABC (*ATP binding cassette superfamily*), MFS (*major facilitator superfamily*) e SMR (*small multidrug resistance*). Essas bombas acabam por exocitar de maneira aleatória os antimicrobianos de seu citoplasma e, dessa maneira, inibem sua ação (VAN BAMBEKE, 2003; BALGANESH et al., 2012).

1.3. Transmissão e Patogenia

A infecção por *M. tuberculosis* ocorre através das vias aéreas, pela formação de aerossóis que são expelidos pelo doente ao tossir. As bactérias presentes nessas gotículas alcançam os alvéolos pulmonares e ali promovem uma infecção primária (ZUIGA et al., 2012; PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017).

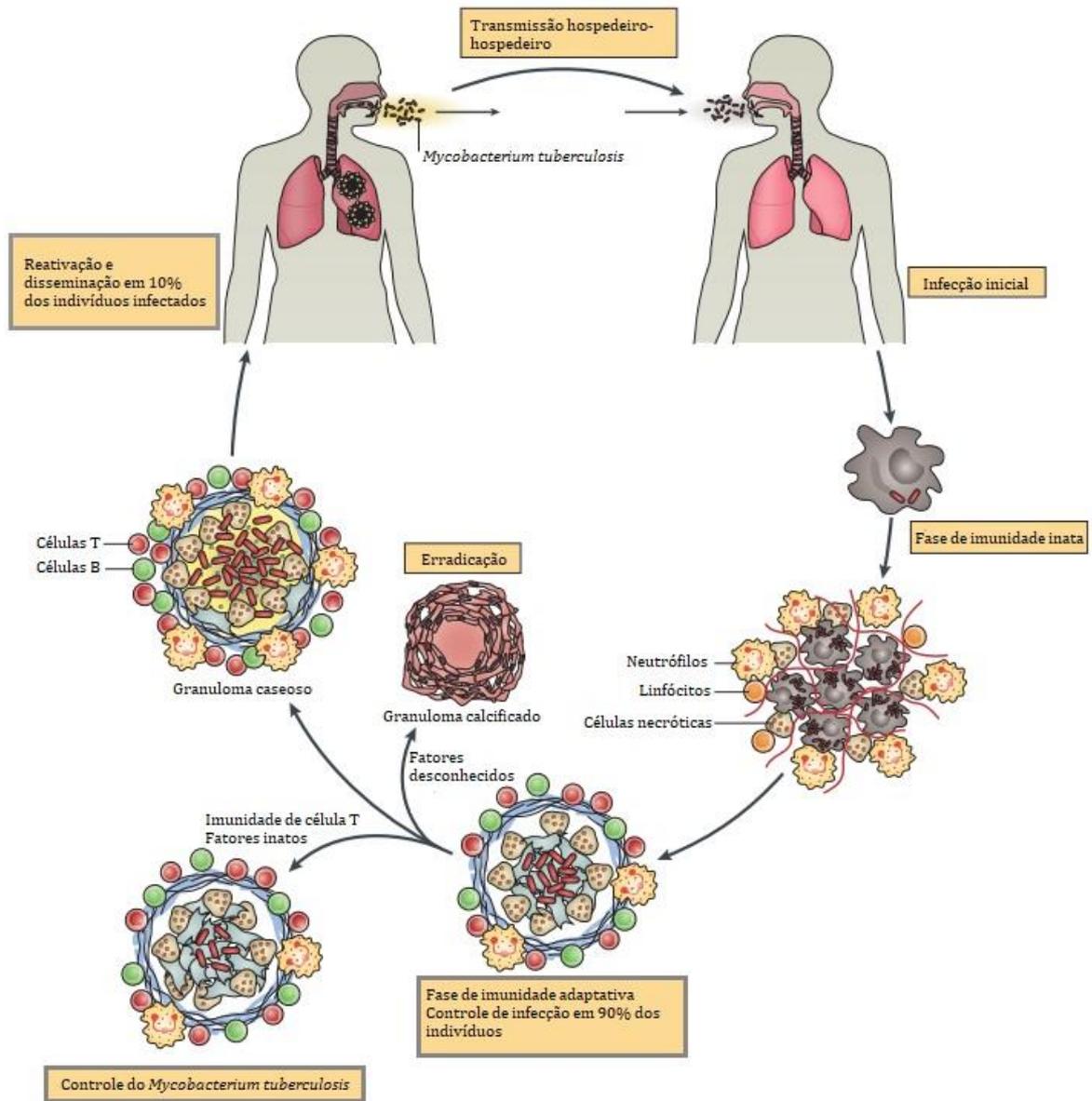


Figura 4. Representação esquemática da transmissão e patogênese da TB. Fonte: Nature Reviews (NUNES-ALVES et al., 2014).

Neste momento, as células imunológicas presentes no tecido, principalmente os macrófagos alveolares, promoverão a fagocitose do bacilo e, dependendo da capacidade imunológica do indivíduo, a infecção poderá ser limitada ou não (NUNES-ALVES et al., 2014).

Em indivíduos imunocompetentes, o sistema imunológico promoverá um controle da infecção, que permanecerá em um estado dormente e assintomático, chamada nesses casos de tuberculose latente (TBL), que ocorre em aproximadamente 90-95% dos casos de infecção e

acomete um terço da população mundial (SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; NILLER et al., 2017; TANG; JOHNSTON, 2017; TURNER et al., 2017).

Essa situação se dá devido a formação de granulomas - constituídos por células imunológicas que isolam e buscam esterilizar o tecido – que mantém a bactéria em estado de hipóxia, impossibilitando-a de se multiplicar (VOSKUIL et al., 2003; SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; NILLER et al., 2017; PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017; TANG; JOHNSTON, 2017).

Porém, em aproximadamente 10% dos casos, em indivíduos imunocomprometidos ou por declínio da imunidade, a doença se manifesta. Os granulomas, que anteriormente continham a disseminação do bacilo, agora se tornam locais com alta concentração micobacteriana e que, na maioria das vezes, não sofre com a ação dos medicamentos. Além disso, o *M. tuberculosis* é capaz de burlar o sistema imunológico, sobrevivendo e se multiplicando dentro das células macrofágicas (VOSKUIL et al., 2003; SCHOREY; SCHLESINGER, 2016).

1.4. Tratamento

Hoje, o tratamento padrão preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) constitui-se da utilização concomitante de quatro antimicrobianos: rifampicina (RFP), etambutol (ETH), pirazinamida (PZA) e isoniazida (INH), administrados em única dose, uma vez ao dia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Na Figura 5 a seguir, são apresentados estes antimicrobianos utilizados na terapia.

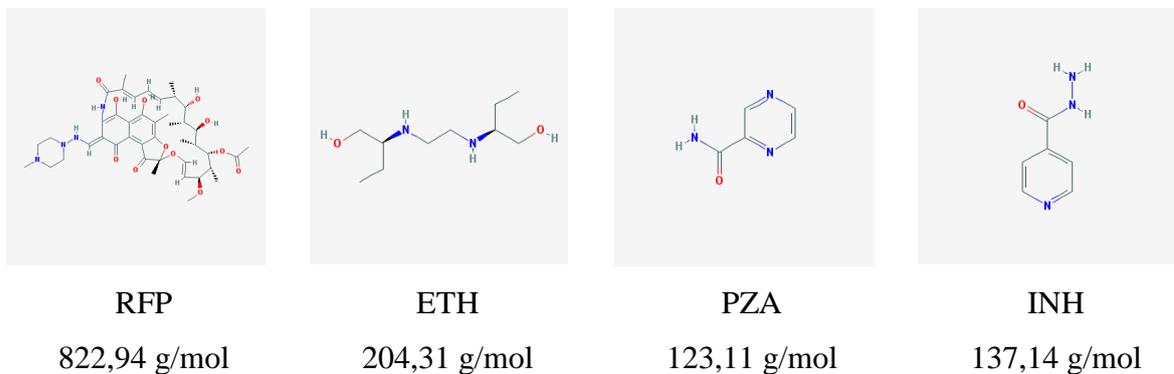


Figura 5. Estrutura e massa molecular dos quatro antibióticos utilizados no tratamento da TB. Fonte: Pubchem.

A RFP atua inibindo a síntese de proteínas através da inibição da atividade da enzima RNA-polimerase, impedindo a transcrição do RNA mensageiro. Possui um amplo espectro de atividade contra cepas gram-positivas e negativas. Uma característica importante se relaciona com sua ação indutora sobre as isoenzimas do citocromo P450, principalmente de *CYP3A4*, provocando diversas interações medicamentosas (ALLIANCE et al., 2008).

O ETH é um inibidor de enzimas arabinosil transferases, envolvidas na biossíntese da parede celular. Devido ao seu mecanismo de ação, apresenta atividade bacteriostática frente bactérias não-replicantes, bactericida contra bacilos replicantes, além de atividade intramacrofágica. Seu espectro de ação é estreito e seus efeitos adversos mais comuns são hepatotoxicidade e neuropatia ótica (ALLIANCE et al., 2008; CHAMBERLAIN et al., 2017; DIAS-FREEDMAN et al., 2017; LARSEN et al., 2017).

A PZA é um pró-fármaco, que atravessa a membrana da micobactéria por difusão passiva e que, no citoplasma, é transformada em ácido pirazinóico (POA). O POA promove acidificação do meio intracelular, alterando as características de permeabilidade e transporte da membrana, provocando dano celular além de interagir com enzimas ligadas a fase de tradução da síntese de proteínas, inibindo sua síntese. O espectro de atividade da PZA é restrito, agindo apenas contra o gênero das micobactérias e seus efeitos adversos mais comuns são hepatotoxicidade e hiperuricemia (ALLIANCE et al., 2008; SHEEN et al., 2013; PICHHOLIYA et al., 2016; GUO et al., 2017).

A INH inibe a síntese dos ácidos micólicos presentes na parede celular das micobactérias através da inibição da enzima *InhA*. Para exercer sua função, precisa sofrer metabolização prévia de uma enzima catalase-peroxidase chamada *KatG*, sendo também um pró-fármaco. Assim como o ETH, também possui atividade bactericida contra micobactérias em estado ativo e ação bacteriostática para aquelas não-replicantes. Possui espectro de atividade restrito ao gênero *Mycobacterium* e apresenta efeitos adversos relacionados com xerostomia, reações alérgicas, hepatotoxicidade, metemoglobinemia, entre outros (ALLIANCE et al., 2008; PINHEIRO et al., 2014).

Apesar de funcional, este esquema atual de tratamento ainda é longo, totalizando 6 meses para sua conclusão, quando se obtém sucesso. Esse período extenso compromete a adesão do paciente que, por muitas vezes, acaba abandonando o tratamento devido ao tempo e aos efeitos adversos relacionados, principalmente a hepatotoxicidade provocada por todos os antimicrobianos (CHINTA et al., 2016).

Com o objetivo de melhorar a adesão ao tratamento, em 1993 a OMS elaborou e recomendou a metodologia do Tratamento Diretamente Observado (TDO), que visa promover

a adesão ao tratamento através da informação ao paciente sobre sua real situação e da visualização das administrações diárias, principalmente na primeira fase da terapia. No Brasil, onde a taxa de abandono chega a ser maior que 5% e que, em 2016, notificou mais de 82 mil novos casos de TB, a implementação da TDO tem funcionado como um meio para aumentar a taxa de sucesso do tratamento que, ainda em 2016, chegou apenas a 71% (BERALDO et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O abandono do tratamento pode levar à seleção de cepas resistentes e assim, o mesmo se altera e prologa ainda mais, por no mínimo dois anos. Nos casos de resistência, as cepas podem ser classificadas como MDR-TB ou XDR-TB. As MDRs-TB ou cepas multidrogas-resistentes apresentam resistência à RFP e INH e, nestes casos, são utilizados para o tratamento os fármacos de segunda linha, que incluem as classes de antibióticos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. As XDRs-TB, cepas extensivamente resistentes, apresentam resistência à RFP, INH e algum medicamento das classes dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas e seu tratamento é bastante complexo, não havendo ainda qualquer regime de tratamento padrão preconizado para estes casos (ALLIANCE et al., 2008; DA SILVA et al., 2011; PRASAD; SRIVASTAVA, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Durante a terapia de cepas XDR-TB são utilizados diferentes esquemas de tratamento, nos quais diversos antimicrobianos são associados sem que haja um modelo padrão a ser seguido. O que se preconiza é a utilização de seis antimicrobianos na fase intensiva de tratamento seguido pelo uso de quatro na fase de manutenção, além disso a utilização da bedaquilina e de fluoroquinolonas de última geração têm mostrado uma melhora nos resultados dos tratamentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

1.5. Novos fármacos

Os últimos fármacos implementados para a terapia de TB, após 60 anos, foram a bedaquilina e a delamanida, que são utilizadas apenas para o tratamento de cepas resistentes. A bedaquilina atua inibindo a ATP sintase micobacteriana, sendo o único fármaco que possui como alvo o metabolismo energético da micobactéria e a delamanida atua inibindo a síntese de ácidos micólicos (DA SILVA et al., 2017; MIGLIORI et al., 2017)

Um dos principais motivos para a busca de novos fármacos se dá por causa da resistência aos antibióticos manifestada pelos bacilos através de diversos mecanismos, sendo os principais mutações em genes relacionados com o alvo farmacológico como, por exemplo, mutações nos

genes *inhA* e *katG* que promovem resistência a INH; mutações em *rpoB* promovem resistência a RFP; em *pncA*, resistência a PZA entre tantos outros (MIOTTO et al., 2017).

Além dos mecanismos de resistência relacionados diretamente com mutações nos alvos farmacológicos destes antimicrobianos citados, o *M. tuberculosis* também consegue impedir a atividade dos fármacos através da ação das bombas de efluxo presentes em sua membrana. Essas bombas, como dito previamente, são capazes de expulsar os fármacos de seu citoplasma, de maneira específica ou não, inibindo sua ação. Para evitar esse mecanismo, novos fármacos ou associações de fármacos inibidores dessas bombas serão necessárias no combate à resistência bacilar (DA SILVA et al., 2011; DE KNEGT et al., 2017).

Um novo fármaco ideal para o tratamento da TB será um composto capaz de eliminar o bacilo em condições extra e intracelulares, em replicação ativa ou em estado não-replicante, que atue contra cepas resistentes, com alto potencial de penetração além de não apresentar toxicidade celular, exibir estreito espectro e que seja efetivo em um curto período de tempo (BHAT et al., 2017).

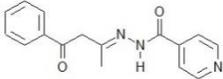
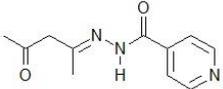
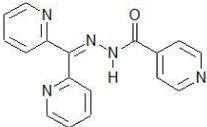
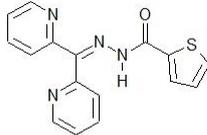
Com esse objetivo, o desenvolvimento de novos compostos que atuem contra o *M. tuberculosis* tem ocorrido de maneira planejada, utilizando-se estruturas químicas conhecidas e funcionais como precursoras para novas moléculas, sendo a INH uma das mais utilizadas (FERRARESI-CUROTTO et al., 2017; HU et al., 2017).

A química medicinal, portanto, vem de encontro às necessidades biológicas para o desenvolvimento de moléculas com potencial antimicrobiano. Na Tabela 1 abaixo, podemos observar as quatro hidrazonas em suas estruturas e nomes químicos, massa molecular e outras informações relevantes.

Essas hidrazonas foram previamente estudadas por Pavan e colaboradores e selecionadas por apresentarem grande capacidade de inibição do crescimento do bacilo em baixas concentrações, além de apresentarem um alto índice de seletividade quando testadas em células macrofágicas por 24h (PAVAN et al., 2010a).

Sendo a estrutura da INH uma hidrazida do ácido isonicotínico, podemos observar que as moléculas hidrazonas 14, 15 e 16 são estruturas baseadas na estrutura química de INH e apresentam diferenças após o grupamento hidrazida enquanto que a molécula 18 é uma modificação da estrutura da 16, que sofreu a substituição do anel piridínico, pertencente a estrutura da INH, pelo anel tiofeno.

Tabela 1. Hidrazonas derivadas da molécula de INH: nome, estrutura e massa molecular (MM), valores de cLogP, concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente *M. tuberculosis* H₃₇Rv, índice de citotoxicidade (IC₅₀) frente células macrofágicas J774A.1 e índice de seletividade (IS).

Estrutura molecular				
Nome	Monobenzoil cetona isonicotinoil hidrazona	Monoacetil cetona isonicotinoil hidrazona	N-(di(2-piridil) metileno) isonicotino hidrazida	N-(di(2-piridil) metileno) tiofeno-2-carbohidrazida
Referência	14	15	16	18
MM	281,31 g/mol	219,24 g/mol	303,32 g/mol	308,36 g/mol
cLogP*	1.65	0.10	2.58	3.17
MIC ₉₀	3,13 µg/mL	6,25 µg/mL	3,13 µg/mL	1,56 µg/mL
IC ₅₀	1250 µg/mL	1250 µg/mL	625 µg/mL	625 µg/mL
IS	399	200	200	401

Fonte: (PAVAN et al., 2010a); estruturas químicas: autor (BKchem) *=cLogP calculado em ChemBioDraw Ultra 14.0.

Portanto, compreendendo a situação da TB no mundo, o ciclo patogênico da doença e todas as formas nas quais o bacilo se encontra durante a infecção *in vivo* (ativo, latente e intramacrofágico) e com o objetivo de responder às necessidades para a descoberta de novos fármacos (toxicidade, espectro de atividade e mecanismo de ação), as hidrazonas foram testadas frente ao *M. tuberculosis* em diferentes condições experimentais afim de se avaliar seus possíveis potenciais como novos fármacos bem como estudar seus mecanismos de ação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade de quatro moléculas hidrazonas frente ao *M. tuberculosis* em diferentes condições e investigar seus possíveis mecanismos de ação.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ação das hidrazonas frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) em estado ativo, em latência (hipóxia) e intracelularmente (em células macrofágicas);
- Avaliar o perfil de ação afim de se classificar sua atividade em bactericida ou bacteriostática;
- Avaliar a citotoxicidade frente células MRC-5 e J774A.1 em diferentes tempos;
- Avaliar o espectro de atividade frente cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas;
- Investigar possíveis mecanismos de ação, relacionados à:
 - Inibição de bombas de efluxo;
 - Inibição de síntese de ácidos micólicos da parede celular;
 - Inibição da síntese de proteínas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As metodologias executadas e descritas nesta seção do trabalho foram realizadas seguindo-se as etapas descritas na figura 6 a seguir.

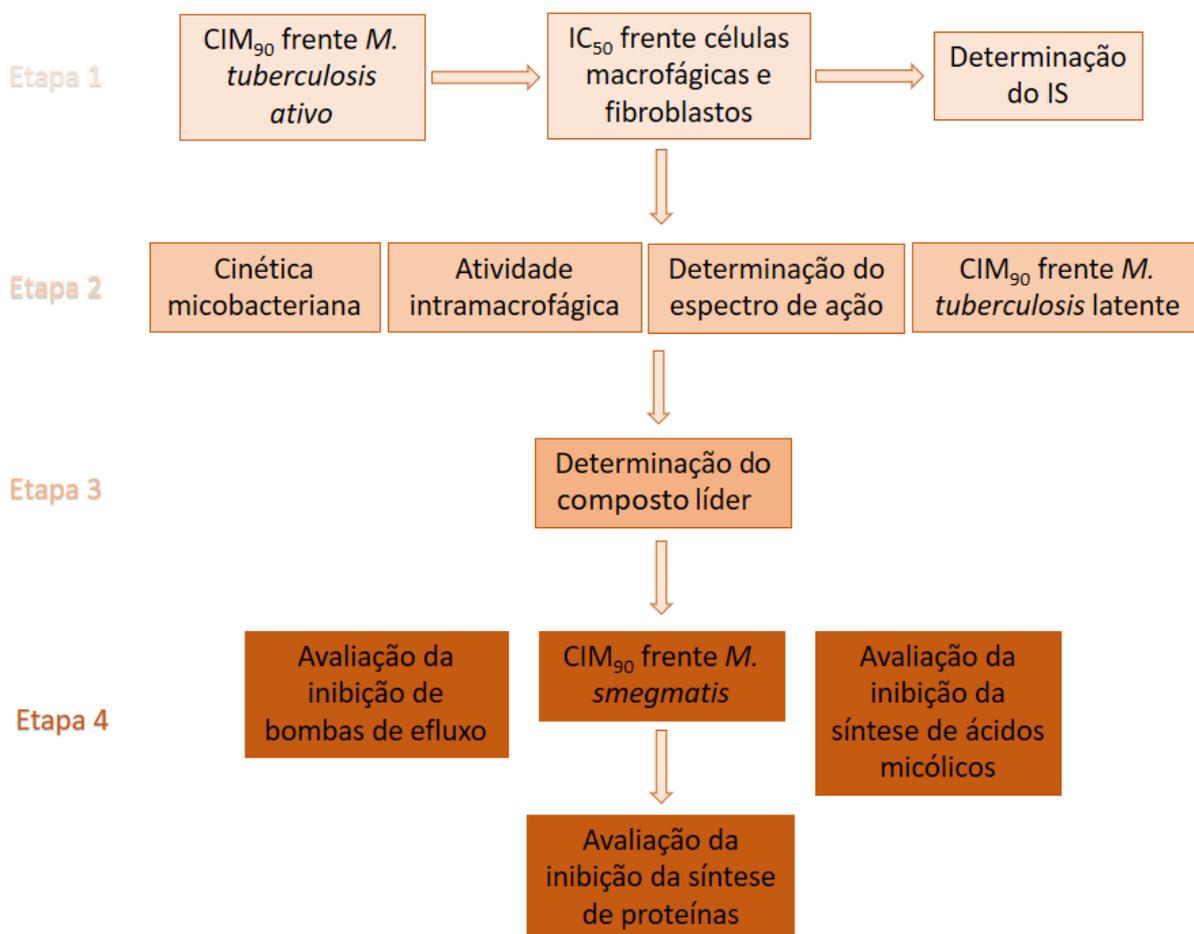


Figura 6. Etapas de análise das hidrazonas. Métodos apresentados na mesma linha foram realizados de maneira concomitante e as flechas indicam processos sequenciais.

3.1. Síntese das Hidrazonas

As hidrazonas 14, 15, 16 e 18, apresentadas na Tabela 1, foram sintetizadas e fornecidas pelo grupo do Prof^o Dr. Pedro Ivo Maia, do Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Toda metodologia de síntese e caracterização das moléculas foi publicada por Pavan e colaboradores, em 2010 (PAVAN et al., 2010a).

3.2. Cepas de *M. tuberculosis*

A cepa utilizada para os experimentos de REMA (*Resazurin Microtiter Assay*), cinética bacteriana e atividade intramacrofágica foi a cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), sensível aos fármacos da terapia de tuberculose.

Para o experimento de LORA foram utilizadas cepas sensíveis transformadas, *M. tuberculosis* H₃₇Rv pFCA-*luxAB* para detecção de luminescência (DOS SANTOS FERNANDES et al., 2017).

As cepas foram armazenadas em freezer -80 °C e, para utilização, foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9, suplementado a 10% com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) a 37 °C e 5% CO₂.

Para o experimento do LORA (*Low-Oxygen Recovery Assay*), as bactérias passaram por um cultivo em meio Dubos, em frasco lacrado, a 37 °C por aproximadamente 15 dias, até turvação e indicação de anaerobiose, provocada pela redução do azul de metileno presente na solução. Este indicador de anaerobiose possui a cor azul na presença de oxigênio e é reduzido quando em ausência do mesmo, tornando-se incolor. Após este período, sabe-se que a bactéria entrou em estado persistente, não-replicante e pode ser utilizada para o experimento (RESCH et al., 1990; PARISH; ROBERTS, 2015).

3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente ao *M. tuberculosis* em estado metabólico ativo

A atividade anti-*M. tuberculosis* dos compostos foi determinada pelo método REMA descrito por Palomino e colaboradores (2002). As soluções estoque das hidrazonas foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido) a 10 mg/mL e diluídas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com OADC, para a obtenção de concentrações de 0,09-25 µg/mL. Para a cepa padrão, RFP, solubilizada em DMSO e INH, solubilizada em água, foram utilizadas como controle do experimento em concentrações de 0,004-1,0 µg/mL. Para os experimentos com cepas resistentes, foram utilizados como controle a INH, RFP, ETA, gatifloxacino (GAT) e amicacina (AMK) em concentrações de 0,09-25 µg/mL.

Uma suspensão de *M. tuberculosis*, cultivada em caldo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC até a obtenção de uma turbidez em padrão McFarland N°. 1, foi diluída 1:500 em caldo e, assim, ajustada para 6 x 10⁵ UFC/mL e foram adicionados 100 µL do inóculo a cada

poço de uma microplaca de 96 poços, juntamente com 100 µL dos compostos nas concentrações descritas. As placas foram incubadas em estufa durante 7 dias a 37 °C e 5% de CO₂.

No sétimo dia, foram adicionados 30 µL de resazurina a 0,01%, solubilizada em água. A fluorescência dos poços foi detectada após 24h utilizando-se o leitor de placas Cytation 3 (Biotek®). A Concentração inibitória mínima (CIM₉₀) foi definida como a menor concentração na qual houve 90% de inibição do crescimento das bactérias. Os resultados são demonstrados como a média obtida de três ensaios independentes (PALOMINO et al., 2002).

3.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente ao *M. tuberculosis* em estado não-replicante, em hipóxia.

O método do LORA foi utilizado para avaliar a capacidade dos compostos em inibir o crescimento bacteriano em estado de latência (não-replicante) e em baixa oxigenação.

Para o ensaio, foi realizado inicialmente o processo de transformação do metabolismo bacteriano, do estado ativo e replicante para o estado dormente, não-replicante, seguindo-se o modelo desenvolvido por Wayne (2001).

Para tal, em frasco com tampa de rosca contendo meio Dubos suplementado com albumina (Difco®), foi realizado o inóculo de células transformadas, contendo plasmídeo pFCA-*luxAB* e indicador de anaerobiose, azul de metileno. Com a tampa do frasco completamente vedada e selada com Parafilm®, o cultivo foi mantido a 37 °C, sob agitação em estufa por, aproximadamente, 5-10 dias, até completa ausência de cor do indicador e, assim, um ambiente de hipóxia no frasco. Neste momento foram contabilizadas mais 200h de incubação, sob as mesmas condições, até a condição ideal de latência (PARISH; ROBERTS, 2015).

Podemos observar na figura abaixo, a curva de crescimento obtida em cultivos na presença e ausência de oxigenação. Após o período de incubação descrito, as bactérias alteram seu metabolismo para o estado não-replicante e permanecem vivas, por longos períodos, apesar da condição de hipóxia.

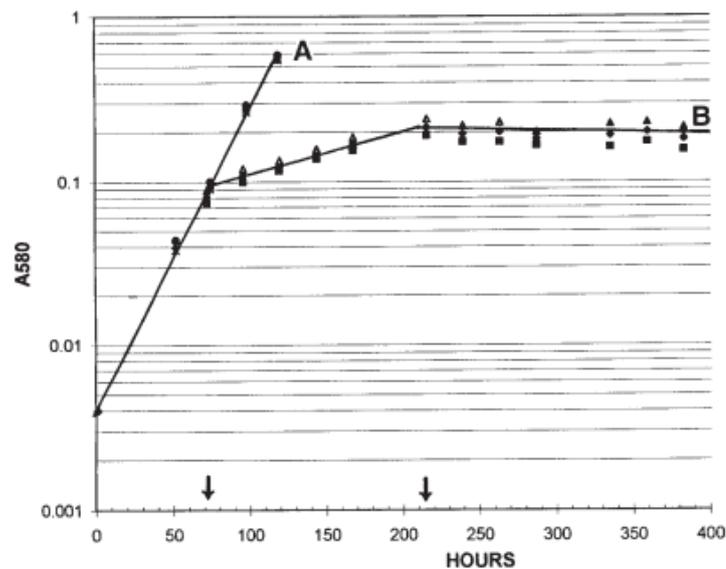


Figura 7. Curvas de crescimento bacteriano em condições de oxigenação (A) e de hipóxia (B). As flechas indicam a mudança de metabolismo para NPR-1 e NPR-2 (estados não-replicantes 1 e 2). Fonte: (WAYNE, 2001).

Seguindo a metodologia descrita por Cho e colaboradores as soluções estoque das hidrazonas foram diluídas em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, para se obter a concentração final de cada composto em um intervalo de 0,3 - 10 µg/mL. Uma alíquota da cultura de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em estado de latência (obtida como descrito anteriormente) foi adicionada à microplaca de 96 orifícios, numa concentração final de 10⁵ UFC/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata, as microplacas foram colocadas em jarras hermeticamente fechadas, acrescidas de um catalisador e um indicador de anaerobiose (GasPak™). A condição de anaerobiose (oxigênio < 0,16%) foi alcançada utilizando o equipamento Anoxomat modelo WS-8080 (MART Microbiology) com 2 ciclos de evacuação e preenchimento com uma mistura de 10% H₂, 5% CO₂, e N₂ balanceado.

As jarras foram incubadas a 37 °C por 10 dias. Após este período, as placas foram retiradas das jarras e incubadas em estufa a 37 °C por 28h para a recuperação do metabolismo bacteriano. Após as 28h, uma solução de 1% de n-decanal em etanol foi diluída 10x em PBS e 100 µL foi adicionado a cada poço para leitura da luminescência.

Compostos que reduziram a viabilidade da bactéria, levaram a uma diminuição no sinal da luciferase após recuperação aeróbia. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação de 90% das células de *M. tuberculosis* em estado de latência (CHO et al., 2007).

3.5. Determinação do índice de citotoxicidade (IC₅₀) frente células macrófágicas (J774A.1) e fibroblastos pulmonares (MRC-5).

Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células MRC-5 (ATCC CCL-171) e J774A.1 (ATCC TIB-67), descongeladas e cultivadas em meio DMEM (Vitrocell®) e RPMI (Vitrocell®), respectivamente, enriquecidos com 10% de soro fetal bovino e acrescidos de sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L).

As células foram cultivadas em garrafas e incubadas à 35 °C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular. Um volume de 2,5 x 10⁵ células/mL de MRC-5 e 1,0 x10⁶ células/mL de J774A.1 foram semeados em microplaca de 96 orifícios, com volume final de 100 µL, incubadas por 24h à 37 °C com 5% CO₂ para permitir a adesão celular. Após este período, os compostos foram acrescentados às placas num intervalo de diluição de 0,39-100 µg/mL com incubações de 24h, 48h e 72h à 35 °C e 5% de CO₂, em meios ausentes de antibiótico e antimicótico.

Após esse período, foram adicionados 50µL de 0,01% de resazurina (solubilizada em água destilada e estéril) e, após 3h, a leitura de fluorescência foi realizada utilizando-se o leitor Synergy H1 (Biotek®). O valor de IC₅₀ foi definido como a menor concentração das hidrazonas em que 50% das células permaneceram viáveis (PAVAN et al., 2010b).

3.6. Cinética Bacteriana

Para a cinética bacteriana, as hidrazonas foram preparadas em DMSO a 10 mg/mL. Essa solução foi então diluída em meio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com OADC, de forma que sua concentração final em contato com a micobactéria fosse igual ou duas vezes maior que o valor da CIM₉₀ previamente estabelecida pelo método de REMA.

A concentração inicial de *M. tuberculosis* em solução foi de 3-5 x 10⁵ UFC/mL. Como controle do experimento foi utilizado meio de cultura contendo apenas micobactérias na mesma concentração, além de RFP e INH nas concentrações de CIM e 2x CIM. As amostras foram incubadas em agitador orbital a 37 °C e 0,3 xg(121 rpm), por um período de 15 dias. A partir do dia 1 e a cada 48h, foram retiradas alíquotas que eram diluídas em série para plaqueamento em ágar Middlebrook 7H10 enriquecido com OADC.

Essas placas de meio sólido foram incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera a 5% de CO₂ por um período de 20-30 dias para contagem de UFC/mL. O experimento foi realizado em três ensaios independentes e os resultados foram expressos pela média aritmética e erro padrão

do número de UFC/mL e, com os valores obtidos, foi possível traçar uma curva representando o número de bactérias viáveis em logaritmo decimal (ordenada) em função do tempo de exposição em dias (abscissa) (DE STEENWINKEL et al., 2010).

3.7. Atividade intramacrofágica

A atividade intramacrofágica foi determinada através da infecção *in vitro* de macrófagos por bactérias *M. tuberculosis* H₃₇Rv. As células macrofágicas J774A.1 foram cultivadas em meio RPMI por aproximadamente 7 dias para sua utilização no experimento. Uma quantidade de 5×10^5 cel/mL foi semeada em poços de uma placa de 24 poços e incubada por 24h a 35 °C, atmosfera a 5% CO₂ até a obtenção de confluência celular. Após este período foi então realizada a fagocitose, processo que ocorreu após a adição de 10×10^5 UFC/mL de inóculo de *M. tuberculosis*, por um período de 2h. Após a incubação, a fim de se certificar que todas as bactérias presentes ao final do experimento fossem aquelas previamente fagocitadas, realizou-se adição de solução de amicacina a 200µg/mL para esterilização do meio extracelular. Para se confirmar a infecção, foram lisadas as células de dois poços da placa com Triton 0,1% (Sigma®) e um volume desse lisado foi transferido para placa de petri contendo ágar Middlebook 7H10 para análise da infecção pré-tratamento.

A análise da atividade das hidrazonas ocorreu através da adição de 1mL da solução das hidrazonas, diluídas em meio RPMI, em valores iguais ou quatro vezes maior ou menor que sua CIM₉₀. Como controle, foi utilizada RFP nas mesmas concentrações. A placa de 24 poços, contendo as células e o tratamento, foi incubada nas mesmas condições previamente descritas por 72h.

Após os 3 dias, os poços foram lavados e as células lisadas com 1 mL de Triton 0,1%. A solução contendo células macrofágicas lisadas e *M. tuberculosis* foi então diluída seriadamente e plaqueada em meio sólido Middlebook 7H10. Essas placas foram incubadas por um período de 20-30 dias, a 37 °C e 5% de CO₂ para a contagem de UFC/mL. O resultado é demonstrado como a média de dois ensaios independentes e demonstra a porcentagem de inibição do crescimento das micobactérias intracelulares pelas hidrazonas comparado ao crescimento obtido dos poços sem tratamento após as 72h.

3.8. Espectro de Atividade

A determinação do espectro de atividade foi realizada afim de se determinar o potencial das hidrazonas frente outras cepas bacterianas. Foram utilizadas *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

O cultivo das espécies bacterianas foi realizado em placas com meio Luria-Bertani (LB) sólido, com repiques semanais. A cada três semanas o cultivo foi reiniciado com suspensão bacteriana estoque mantida a -80°C , com a finalidade de se evitar possíveis contaminações e resistência. Foi utilizado como controle um fármaco do grupo dos aminoglicosídeos, a gentamicina.

Os ensaios de microdiluição foram realizados seguindo o protocolo estabelecido pelo manual CLSI “*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*” de 2012, com alterações: as cepas bacterianas foram cultivadas em meio LB líquido, durante 20h em agitador orbital a 0,4 g (200rpm) e 37°C . Foram então diluídas até 5×10^5 UFC/mL e 100 μL de inóculo foram adicionados a outros 100 μL dos compostos em concentrações de 0,39-100 $\mu\text{g/mL}$. Após 24h foi realizada a leitura da absorvância a 600nm em leitor de placas Synergy H1 (Biotek®). O resultado é demonstrado como a média de três ensaios independentes (NCCLS, 2005).

3.9. Avaliação da inibição da síntese de ácidos micólicos - CCD

Para avaliar se o mecanismo de ação apresentado pelas hidrazonas se relaciona com a inibição da síntese dos ácidos micólicos foi realizado tratamento, extração e análise dos ácidos micólicos seguindo a metodologia de Jyoti e colaboradores, com modificações (JYOTI et al., 2015).

Uma cultura de *M. tuberculosis* H₃₇Rv foi cultivada em meio Middlebrook 7H9, suplementado com OADC a 10% por 5 dias. Foi realizado o ajuste da concentração em DO₆₀₀ para 0,3 e então 10 mL de cultivo foi incubado por 20h a 37°C com ou sem tratamento. Nos inóculos tratados, os compostos foram adicionados em seu valor de 2x CIM₉₀. Foram utilizados como controle os fármacos RFP, INH, etionamida (ETA) e etambutol (ETH).

Após o tratamento, foram realizadas lavagens e extração dos ácidos micólicos por meio da adição de 10 mL de solução contendo metanol : tolueno : H₂SO₄ concentrado (10:10:0,4) e incubação a 50°C por 16h-18h em banho-maria. As amostras foram retiradas e resfriadas a temperatura ambiente e adicionou-se em seguida 2 mL de hexano, seguido de vigorosa agitação e repouso para separação de fases.

A solução sobrenadante contendo os ácidos micólicos foi retirada e concentrada por evaporação em capela com exaustão de ar e aplicou-se sobre placas de alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®, 5 x 10 cm, 15-40 µm, 0,25mm) para desenvolvimento da cromatografia em camada delgada (CCD). O volume de aplicação foi de 20 µL. Como fase móvel foi utilizada solução de hexano : éter etílico : ácido acético (60:38:02). A revelação foi realizada por vaporização de anisaldeído sulfúrico, seguido por carbonização a 110 °C por 10 min.

3.10. Avaliação da inibição de bombas de efluxo

Afim de se determinar a capacidade das hidrazonas em inibir a atividade das bombas de efluxo, realizou-se a técnica de acúmulo de brometo de etídio (EtBr), que possui a capacidade de se intercalar à cadeia de DNA (ácido desoxirribonucleiro), emitindo alta fluorescência intracelular. Assim, quando a atividade das bombas é inibida, ocorre acúmulo de brometo intracelular enquanto que, sem a inibição, a fluorescência aparente é baixa já que as bombas são capazes de exocitar o brometo que entra por difusão passiva (VARDEVANYAN et al., 2003; RODRIGUES et al., 2011).

De acordo com a metodologia descrita por Caleffi-Ferracioli e colaboradores, um inóculo de *M. tuberculosis* foi ajustado para uma concentração em DO₆₀₀ de 0,4 e 100 µL dessa solução foi adicionado aos poços de uma microplaca de 96 poços. Foram acrescentados ainda, em concentrações iguais a ½ CIM₉₀, 50 µL de EtBr e 50 µL do composto a ser testado. Como controles foram utilizados verapamil, RFP e INH (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2016).

A placa então foi incubada em leitor de placas, Cytation H1, e a fluorescência foi lida a cada 3 min, pelo período de 1 hora, resultando em 21 pontos de uma curva analítica em gráfico de fluorescência relativa com relação ao tempo e através das curvas obtidas foi possível averiguar a capacidade do composto em inibir a atividade das bombas de efluxo.

3.11. Avaliação da inibição de síntese de proteínas

O ensaio que busca investigar possível mecanismo de ação relacionado à maquinaria de transcrição e tradução bacteriana foi realizado com cepas de *M. smegmatis* mc²155 (ATCC 700084) e micobacteriófagos D29.

O princípio do método se baseia na necessidade dos fagos em utilizar toda a maquinaria de síntese de proteínas da bactéria para sua reprodução. Durante o ciclo lítico, o fago reproduz

seu material genético e sintetiza as proteínas de seu capsídeo utilizando a maquinaria de síntese proteica bacteriana e, quando em grande quantidade, promove a lise da bactéria para continuar seu processo infeccioso (KARTHIK; MUNESWARAN; MANJUNATHACHAR, 2014).

Em meio de cultura, a lise das bactérias é visualizada como na figura a seguir, na qual é possível observar placas de lise formada pela multiplicação viral.

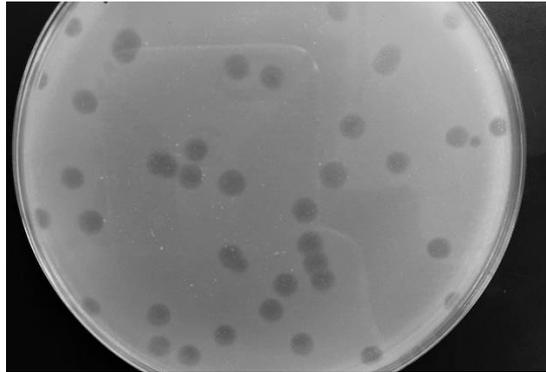


Figura 8. Placa de cultivo exemplificando as placas de lise formadas por fagos em seu ciclo lítico. Fonte: Hope College: “*Discovering a mycobacteriophage*”.

Assim, quando um composto é capaz de inibir o processo de síntese de proteínas em uma bactéria, os vírus não conseguirão se reproduzir e lisar a mesma e, através da inibição ou da observação de placas de lise formada pelos fagos poderemos identificar compostos inibidores da síntese de proteínas bacteriana.

Portanto, para início do desenvolvimento do método, tornou-se necessária a determinação da CIM₉₀ da hidrazona frente ao *M. smegmatis*.

Essa espécie micobacteriana apresenta alta similaridade genética com o *M. tuberculosis*, menor tempo de geração, além de não ser capaz de promover infecção e, por isso, é bastante utilizada em substituição ao *M. tuberculosis* (MC; STRAINS, 2015).

3.11.1. Determinação da CIM₉₀ frente ao *M. smegmatis*

O ensaio foi realizado através da metodologia de REMA descrita anteriormente (Palomino *et al.*, 2002). Apenas neste caso, o cultivo bacteriano de *M. smegmatis* foi realizado em meio *Middlebrook 7H9* enriquecido com 10% de OADC (Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) acrescido de Tween 80 à 0,05%. O inóculo foi incubado por dois dias numa temperatura de 37°C e utilizado na concentração de 5×10^5 UFC/mL. Foram testados, além da hidrazona 14, os fármacos controle RFP e INH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente ao *M. tuberculosis* em estado metabólico ativo e não-replicante.

A atividade das hidrazonas frente o *M. tuberculosis* em estado ativo e não-replicante foi avaliada através das metodologias do REMA e LORA, respectivamente, e os valores da CIM₉₀ estão demonstrados na Tabela 2 abaixo. Os resultados são as médias calculadas a partir de três ensaios independentes e foram utilizados como controles do experimento os fármacos da terapia, RFP e INH. São considerados compostos promissores aqueles que apresentarem valores de CIM₉₀ ≤ 10 µg/mL.

Tabela 2. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente cepa sensível de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em estado metabólico ativo (REMA) e não-replicante (LORA). Valores apresentados como média e desvio padrão (M ± DP) de três ensaios independentes em µg/mL e µM.

Compostos	CIM ₉₀ (REMA)		CIM ₉₀ (LORA)	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM
14	0,35 ± 0,15	1,23 ± 0,53	1,78 ± 1,61	6,31 ± 5,72
15	11,89 ± 0,32	54,24 ± 1,46	2,07 ± 0,36	9,44 ± 1,64
16	1,82 ± 0,68	6,01 ± 0,22	2,35 ± 1,73	7,76 ± 5,70
18	5,30 ± 0,25	17,17 ± 0,81	1,78 ± 0,93	5,77 ± 3,02
RFP	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,001	< 0,3	< 0,36
INH	0,06 ± 0,04	0,44 ± 0,29	> 45,0	> 328,13

Entre os valores de CIM₉₀ obtida frente as bactérias em estado metabólico ativo podemos dizer que a hidrazona 14 é a que apresenta melhor atividade com CIM₉₀ de 0,35 µg/mL seguida pelas hidrazonas 16, 18 e 15 com concentrações inibitórias de 1,8, 5,3 e 11,9 µg/mL, respectivamente. Apenas a hidrazona 15 apresentou uma CIM₉₀ acima do valor ideal, demonstrando uma menor capacidade inibitória frente ao bacilo.

Comparado os valores de CIM₉₀ das hidrazonas com os fármacos da terapia, nenhuma delas apresentou atividade superior à RFP ou à INH, com valores de CIM₉₀ de 0,04 e 0,06 µg/mL, respectivamente.

Contraopondo os valores de CIM₉₀ publicados anteriormente, podemos observar uma variação nos valores de CIM₉₀ para todas as moléculas. Com relação às hidrazonas 14 e 16, que apresentavam valores de CIM₉₀ de 3,13 µg/mL, houve uma diminuição de 10x e 2x,

respectivamente. Para as hidrazonas 15 e 18, com CIM₉₀ de 6,25 e 1,56 µg/mL, os valores aumentaram em quase 2x e 3,5x, respectivamente.

Essas alterações provavelmente aconteceram devido a uma modificação na metodologia executada, na qual alterou-se o meio de cultura, que anteriormente era suplementado com Tween 80 a 0,05% (PAVAN et al., 2010a).

Este tensoativo não-iônico é capaz de diminuir a tensão superficial, aumentando a solubilidade e biodisponibilidade, sendo também capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular e, assim, modificar a resposta do microrganismo ao composto e, por isso, não foi mais utilizado, o que pode justificar a alteração destes resultados (MASAKI et al., 1990; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; LIANG et al., 2018).

No ensaio realizado com bactérias em estado não-replicante, os valores de CIM₉₀ foram bastante próximos, principalmente se considerarmos o desvio padrão encontrado, variando apenas entre 1,7 e 2,3 µg/mL. Comparando-se aos fármacos da terapia, apenas a RFP apresentou atividade, com CIM₉₀ menor que 0,36 µg/mL. A INH, como esperado, não apresentou atividade contra as bactérias em estado não-replicante, devido ao mecanismo de ação desempenhado por este antimicrobiano.

Com relação a atividade das hidrazonas frente ao bacilo em estado dormente ou não-replicante é importante salientar que essa atividade é bastante significativa visto que, neste estado metabólico, o *M. tuberculosis* é considerado resistente à maioria dos fármacos utilizados na terapia (SIRICILLA et al., 2014).

O estado não-replicante de *M. tuberculosis* se baseia na capacidade do bacilo em persistir no tecido infectado, por longos períodos de tempo, sem se multiplicar e nem perder a habilidade de provocar a doença. Ainda segundo a literatura, a hipóxia é um fator importante para a indução deste estado onde há restrição da atividade biológica para conservação de energia e diminuição da necessidade de reparos além da ativação de vias alternativas para a produção de energia. Nessa condição não-replicante persistente o bacilo apresenta maior resistência aos antimicrobianos devido à diminuição do metabolismo (WAYNE; SOHASKEY, 2001; DEVASUNDARAM et al., 2015; PARISH; ROBERTS, 2015)

Diante destes resultados, algumas hipóteses podem ser levantadas se, primeiramente, retomarmos em detalhes o mecanismo de ação da INH, que é a molécula precursora das hidrazonas 14, 15 e 16.

A INH é um pró-fármaco que sofre metabolização pela enzima KatG, sintetizada pelo *M. tuberculosis*. Após a metabolização, um aduto entre INH e NAD é formado e é esta molécula

que se liga e inibe a enzima InhA, responsável pela síntese de ácidos graxos que resultarão na biossíntese dos ácidos micólicos da parede celular, como esquematizado na Figura 9 (ALLIANCE et al., 2008; ANDRADE et al., 2008).

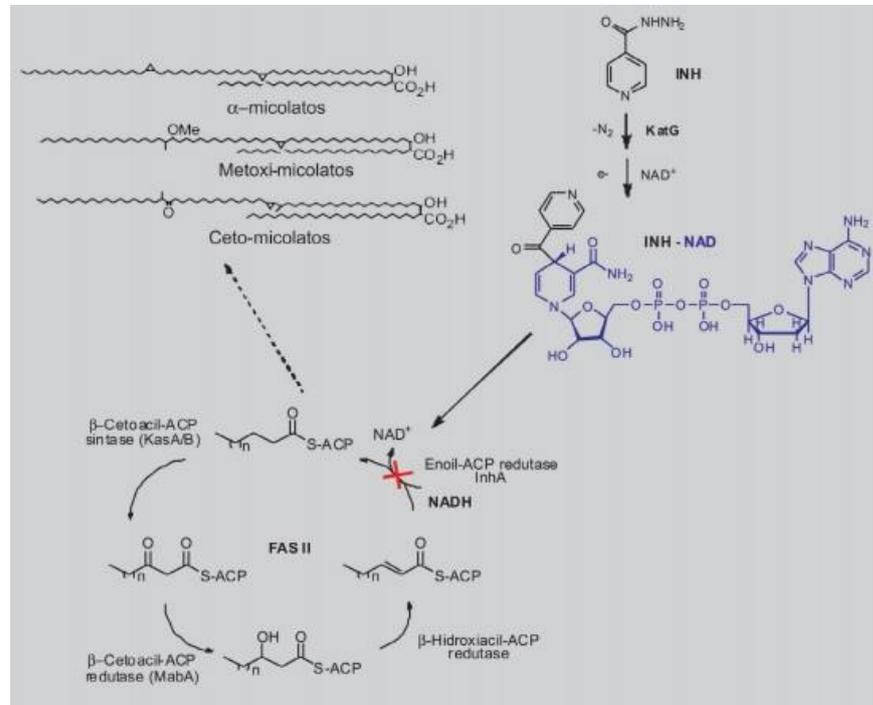


Figura 9. Mecanismo de ação da isoniazida. Metabolização por KatG e inibição enzimática de InhA (ANDRADE et al., 2008).

A INH inibe a síntese dos ácidos micólicos quando as bactérias estão em estado ativo, situação na qual a síntese da parede celular ocorre de maneira intermitente, porém, a INH não é ativa contra cepas em estado de dormência, ou não-replicantes, pois nesta condição não há síntese ativa de parede celular já que o bacilo diminui drasticamente sua atividade metabólica e sua produção enzimática (WINDER; COLLINS, 1970; WAYNE; SOHASKEY, 2001; SIRICILLA et al., 2014).

Essa ausência de atividade inibitória da INH frente o *M. tuberculosis* em estado não-replicante foi confirmada pelo ensaio do LORA, no qual a CIM₉₀ de INH é superior a 45 µg/mL.

Portanto, sabendo que a atividade de INH é dependente de metabolização e comparando as atividades das hidrazonas com INH, podemos sugerir que as hidrazonas são ativas frente o *M. tuberculosis* de maneira independente de INH, já que apresentaram atividade frente o bacilo em estado não-replicante, podendo ainda atuar em mecanismo de ação diferente de INH, considerando que o alvo molecular destas moléculas está em funcionamento durante o estado de dormência.

Ainda diante destes resultados, podemos supor que um mecanismo de ação possível para essas hidrazonas é inibição da síntese de proteínas ou de ATP, isso porque, se considerarmos os estados metabólicos avaliados, estes processos são os únicos que não se alteram no estado não-replicante, situação evidenciada pela atividade inibitória da RFP que é mantida nesta condição.

Além disso, outros fármacos utilizados na terapia que inibem a síntese proteica ou a síntese de ATP e que também exibem atividade frente bactérias em hipóxia são a capreomicina e a bedaquilina, respectivamente (ALLIANCE et al., 2008; FIELD, 2015).

Como explicitado anteriormente, a INH não é ativa contra as bactérias em estado não-replicante por ter sua ação sobre a síntese dos ácidos micólicos, processo este diminuído quando em latência. Dessa forma, se as hidrazonas agissem por este mecanismo, provavelmente uma diminuição em seu potencial inibitório seria evidenciada, um resultado diferente do obtido.

4.2. Resultados de Índice de citotoxicidade (IC₅₀) frente células macrofágicas e fibroblastos pulmonares em 24, 48 e 72 horas.

Afim de avaliar a toxicidade das hidrazonas frente células eucarióticas foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vitro* frente células macrofágicas e fibroblastos pulmonares, em diferentes tempos, e os resultados obtidos estão demonstrados nos gráficos 1 e 2 a seguir, respectivamente.

As concentrações que inibiram 50% do crescimento celular aparecem no eixo das ordenadas como o índice de citotoxicidade (IC₅₀) e, no eixo das abcissas, os diferentes tempos de tratamento de cada uma das moléculas.

A análise estatística foi realizada de maneira a se comparar a toxicidade apresentada pela hidrazona com relação à isoniazida sendo que, quando a diferença estatística é significativa ($P < 0,05$), há indicação com *.

Frente as células macrofágicas, podemos observar através do gráfico 1 que a INH é a única molécula que não altera seu perfil de toxicidade ao longo das 72h, sendo que sua concentração citotóxica é $> 100 \mu\text{g/mL}$ em todos os tempos.

Comparando-se as hidrazonas com a INH, as que apresentaram os melhores resultados foram as de número 14 e 16, sendo que ambas apresentam IC₅₀ $> 100 \mu\text{g/mL}$ nas primeiras 24h e, apesar da diminuição da concentração citotóxica após 48 e 72h, a diferença com relação à INH não foi estatisticamente significativa.

A hidrazona 18 apresentou $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ após 24h de tratamento. Porém, após 48h, demonstrou inibição do crescimento celular numa concentração de $20 \mu\text{g/mL}$ e, após 72h, um IC_{50} de aproximadamente $10 \mu\text{g/mL}$. Essa diminuição do IC_{50} de acordo com o tempo não é satisfatória já que, para o tratamento da TB ser efetivo, um período de 24h não seria suficiente e apenas durante esse tempo a hidrazona não inibiu o crescimento celular, permanecendo o inóculo com 100% de viabilidade. Essa toxicidade pode ser justificada pela presença no anel tiofeno em sua estrutura, já que esta é a única parte da molécula que difere da hidrazona 16.

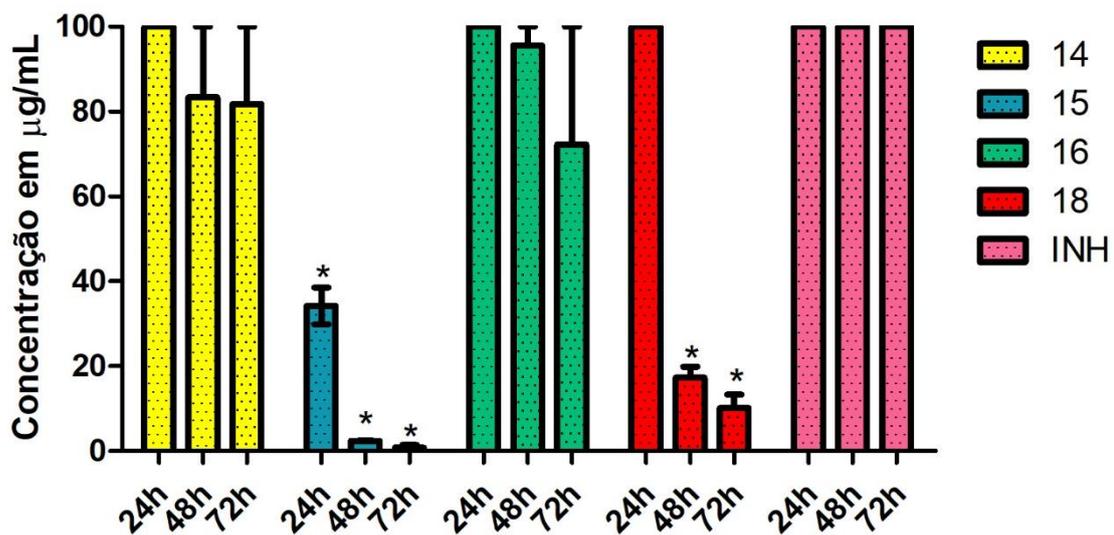


Gráfico 1. Índice de citotoxicidade (IC_{50}) das moléculas hidrazonas e isoniazida (INH) frente à linhagem celular macrófaga, J774A.1. Concentração máxima testada de $100 \mu\text{g/mL}$. Análise estatística por Prisma 5.0: Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. *= diferença estatística significativa com relação ao tratamento com INH no mesmo tempo de tratamento.

O anel tiofeno é conhecido por seu potencial citotóxico *in vivo* devido a sua metabolização e formação de compostos reativos, com consequente hepatotoxicidade. Devido a isso, somado à característica citotóxica, essa molécula não se apresenta como uma das mais promissoras (GRAMEC; MAŠI; DOLENC, 2014).

Já a hidrazona 15 foi a que apresentou maior citotoxicidade, inibindo o crescimento celular já nas primeiras 24h de tratamento numa concentração de aproximadamente $35 \mu\text{g/mL}$ e, após 72h, inibiu o crescimento celular em $1 \mu\text{g/mL}$, valor menor que sua CIM_{90} .

É importante salientar que a análise da citotoxicidade frente células macrófagas foi realizada até 72h para posterior avaliação da atividade intramacrófaga das moléculas. Durante o experimento, as células imunológicas ficam em contato com as hidrazonas por 72h e, portanto, é necessário que se mantenha a viabilidade celular neste intervalo de tempo.

A citotoxicidade frente linhagem celular de fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5) foi realizada com o objetivo de se obter uma análise prévia da toxicidade dos compostos frente células humanas.

Frente aos fibroblastos pulmonares tanto a INH quanto a hidrazona 14 apresentaram valores de $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ em todos os períodos de tratamento avaliados (gráfico 2). Esse resultado é bastante satisfatório já que podemos comparar essa hidrazona com a segurança apresentada pela INH.

A hidrazona 16 também apresentou bons valores de IC_{50} , sendo que a concentração necessária para inibir o crescimento de 50% das células foi maior que $100 \mu\text{g/mL}$ após 24h e, aproximadamente $70 \mu\text{g/mL}$, após as 72h de exposição.

As hidrazonas 15 e 18 foram bastante tóxicas já nas primeiras 24h, com diminuição gradual do IC_{50} de acordo com o tempo.

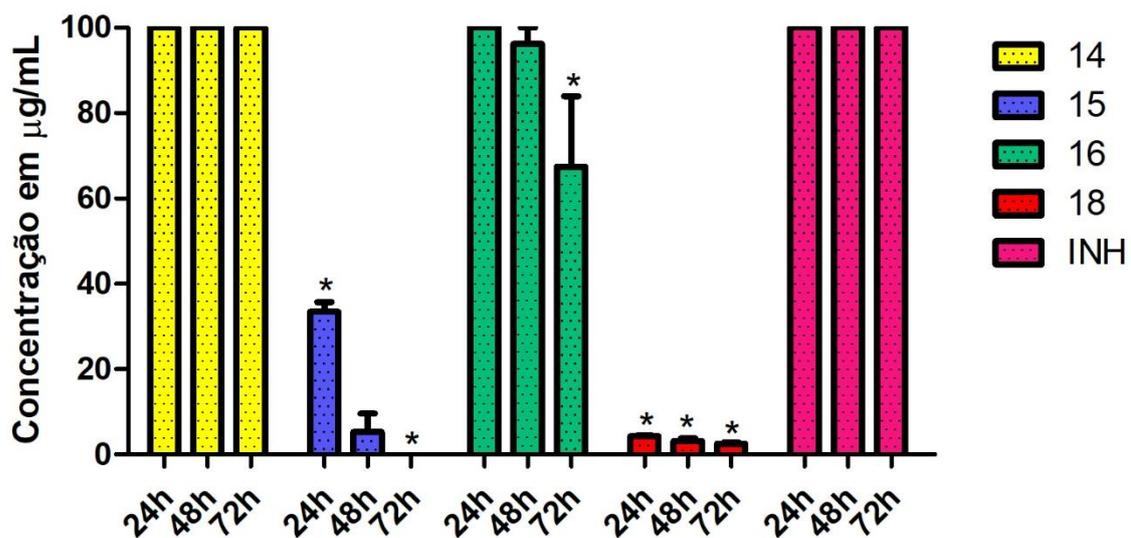


Gráfico 2. Índice de citotoxicidade (IC_{50}) das moléculas hidrazonas e isoniazida (INH) frente à linhagem celular de fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5). Concentração máxima testada de $100 \mu\text{g/mL}$. Análise estatística por Prisma 5.0: Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. *= diferença estatística significativa com relação ao tratamento com INH no mesmo tempo de tratamento.

Os índices de seletividade (IS) encontrados para todas as hidrazonas frente as diferentes células são apresentados na Tabela 3 e demonstram a capacidade do composto em inibir o crescimento de micobactérias de maneira específica, sem interferir na viabilidade celular. Assim, quanto maior o valor do IS, mais seletiva é a molécula e mais seguro é o seu uso.

São considerados resultados positivos os valores de IS > 10. Assim, apenas as hidrazonas 14 e 16 são consideradas não-citotóxicas sendo, portanto, as melhores moléculas do grupo.

Tabela 3. Resultados de índice de seletividade (IS) obtidos para as hidrazonas e isoniazida nos testes de citotoxicidade em 24h, 48h e 72h frente as linhagens celulares de macrófagos murinos (J774A.1) e fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5).

Compostos	MRC-5			J774A.1		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
14	>289,02	>289,02	>289,02	>289,02	240,88	236,46
15	2,76	0,45	0,03	2,87	0,20	0,06
16	>54,85	52,79	36,99	>54,85	52,44	39,65
18	0,73	0,61	2,62	18,88	3,27	1,91
INH	>1666,66	>1666,66	>1666,66	>1666,66	>1666,66	>1666,66

As hidrazonas 15 e 18 foram as que apresentaram os piores índices, demonstrando baixa ou nenhuma seletividade frente as duas linhagens celulares testadas, principalmente após as 72h.

Esses resultados acabam por inviabilizar a continuidade dos estudos com essas moléculas já que, para ser utilizada no tratamento é desejável que a molécula, no mínimo, apresente seletividade em inibir o crescimento do bacilo.

Como as análises do espectro de atividade, da cinética bacteriana e da atividade intramacrofágica foram realizadas de maneira concomitante, os resultados de todas as hidrazonas serão apresentados a seguir.

4.3. Espectro de Atividade

A avaliação do espectro de atividade se faz importante para se conhecer a capacidade do composto em inibir o crescimento de outras bactérias. As cepas escolhidas para a avaliação do espectro são amplamente avaliadas e os resultados, demonstrados na Tabela 4 a seguir, foram obtidos como a média de três ensaios independentes (SIRICILLA et al., 2014; NARENDER et al., 2016).

De maneira geral as hidrazonas apresentam espectro de atividade estreito, já que não inibiram o crescimento de outras bactérias.

Vinculando este resultado à posterior análise do mecanismo de ação possível para essas hidrazonas podemos acreditar que o alvo molecular inibido pelas hidrazonas não é uma

estrutura geneticamente conservada entre outros procariotos já que, em concentrações muito maiores daquelas apresentadas frente o *M. tuberculosis*, essas hidrazonas não foram capazes de inibir outros microorganismos.

Tabela 4. Resultados da atividade frente diferentes cepas bacterianas Gram positivas e negativas, cálculo da concentração inibitória de 90% (CIM₉₀). Valores apresentados como média (M) e desvio padrão (DP) de três ensaios independentes em µg/mL.

Compostos	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
14	>100	>100	>100	>100
15	>100	>100	>100	>100
16	>100	>100	>100	>100
18	>100	>100	>100	>100
Gentamicina	1,16 ± 0,38	2,02 ± 0,66	3,97 ± 2,35	5,07 ± 0,14

Essa característica de espectro de ação estreito é demonstrada também pela bedaquilina, pela capreomicina e pela isoniazida, com ação restrita às micobactérias, uma característica comparável às hidrazonas (ALLIANCE et al., 2008; FIELD, 2015).

4.4. Cinética Bacteriana

Os resultados obtidos das análises realizadas no ensaio de cinética bacteriana são encontrados nos gráficos 3 – 6 apresentados a seguir. São demonstrados os valores de UFC/mL em escala logarítmica, em cada dia de coleta realizada.

Através destes gráficos foi possível observar a curva de crescimento bacteriano quando em meio tratado ou não tratado (controle) e, dessa forma, pudemos determinar o perfil de morte apresentado pelo composto, se bactericida ou bacteriostático.

A diferença entre estes termos se dá na capacidade de matar a bactéria – efeito bactericida – ou apenas inibir seu crescimento – efeito bacteriostático. A diferença é observada a partir da diminuição da concentração do inóculo, sendo que a atividade bactericida ocorre a partir da diminuição de 99,9% das bactérias, ou seja, 3 logs (PANKEY; SABATH, 2004; DE STEENWINKEL et al., 2010; NEMETH; OESCH; KUSTER, 2015).

Todas as hidrazonas foram testadas em seus valores de CIM e 2x CIM para que se pudesse avaliar qualquer alteração no perfil de morte provocado pela hidrazona em maior concentração.

Como controle foram utilizadas RFP e INH nas mesmas concentrações (exceto para INH, testada apenas em 2x CIM) e ambas hidrazonas apresentaram efeito bacteriostático *in vitro*, como já era esperado nestas concentrações. Além disso, a INH apresenta atividade bactericida apenas nos primeiros dias de tratamento pois, após a morte dos microrganismos vulneráveis, restam em solução as bactérias chamadas persistentes (ALLIANCE et al., 2008; DE STEENWINKEL et al., 2010).

Em todos os gráficos é traçada uma linha pontilhada que indica o ponto no qual a concentração do inóculo precisa chegar para que a molécula apresente atividade bactericida.

No gráfico 3 é apresentado o resultado da cinética bacteriana da hidrazona 14. As concentrações utilizadas foram de 0,35 µg/mL (14 I) e 0,7 µg/mL (14 II).

Para a RFP e INH, as concentrações utilizadas foram as mesmas em todas as análises: 0,04 µg/mL e 0,08 µg/mL para RFP I e II, respectivamente e 0,10 µg/mL para INH.

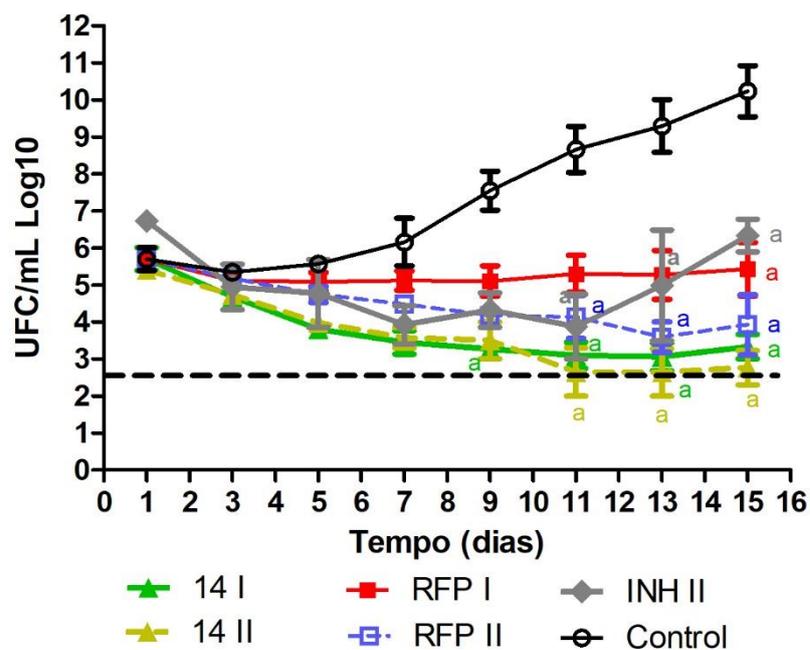


Gráfico 3. Cinética bacteriana da hidrazona 14 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$). I= Concentração igual a 1x CIM₉₀ e II= Concentração igual a 2x CIM₉₀. Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independentes.

Considerando que a concentração inicial do inóculo era de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL e que um efeito bactericida seria atingido numa concentração de $5,0 \times 10^2$ UFC/mL (linha tracejada), podemos considerar a hidrazona 14 como um composto de atividade bactericida.

É possível notar diferença estatística entre o controle do experimento e o tratamento com a hidrazona a partir do nono dia, resultado que se mantém até o final do experimento.

O decaimento observado na curva da hidrazona 14 foi mais acentuado do que o provocado pelos fármacos do tratamento padrão em seus valores de CIM₉₀.

Esse decaimento apresentado pelos fármacos da terapia padrão já era esperado porque, de acordo com De Steenwinkel e colaboradores, para que RFP apresente um potencial bactericida *in vitro* é necessária uma concentração de 8,0 µg/mL, um valor 20x maior que sua CIM₉₀ enquanto que, para INH, o efeito bactericida *in vitro* é alcançado numa concentração maior que 500x sua CIM₉₀, em 64,0 µg/mL (DE STEENWINKEL et al., 2010)

Dessa forma, podemos sugerir que o efeito bactericida da hidrazona 14 é mais acentuado, *in vitro*, do que o efeito apresentado pelos fármacos da terapia demonstrando o grande potencial desse composto como possível novo fármaco.

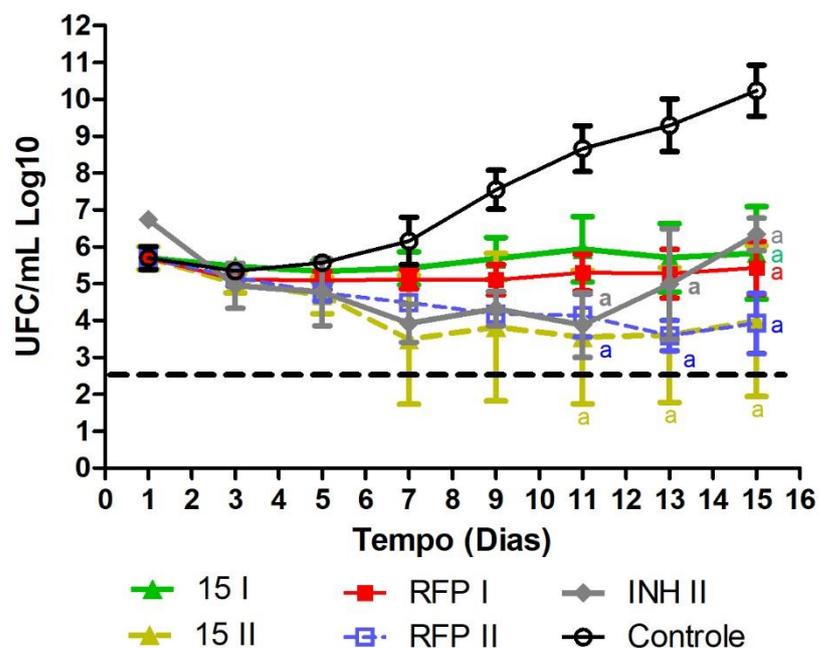


Gráfico 4. Cinética bacteriana da hidrazona 15 e controles de crescimento bacteriano e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$). I= Concentração igual a 1x CIM₉₀ e II= Concentração igual a 2x CIM₉₀. Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independentes.

O resultado da cinética da hidrazona 15 é demonstrado no gráfico 4. As concentrações utilizadas foram de 12 µg/mL e 24 µg/mL para 15 I e 15 II, respectivamente.

A diferença estatística na curva de crescimento da hidrazona 15 com relação ao controle aparece apenas no 15º dia quando do tratamento no valor da CIM₉₀ (em verde) e no 9º dia quando em 2x CIM₉₀ (em cinza).

A curva de crescimento apresentou um leve decaimento, de aproximadamente 2 logs, quando em 2x a CIM₉₀, um resultado que demonstra uma atividade semelhante entre a hidrazona 15 e a RFP quando ambas estão numa concentração duas vezes maior que a CIM₉₀.

Porém, apesar da atividade *in vitro* após 15 dias de exposição ser comparável à RFP, a concentração que atingiu esse efeito é 2x maior que a CIM₉₀ e, levando em consideração os baixos índices de seletividade do composto 15 no valor da CIM₉₀, podemos acreditar que a toxicidade dessa molécula em maiores concentrações seria ainda maior e, assim, seria inviável o tratamento nesta concentração.

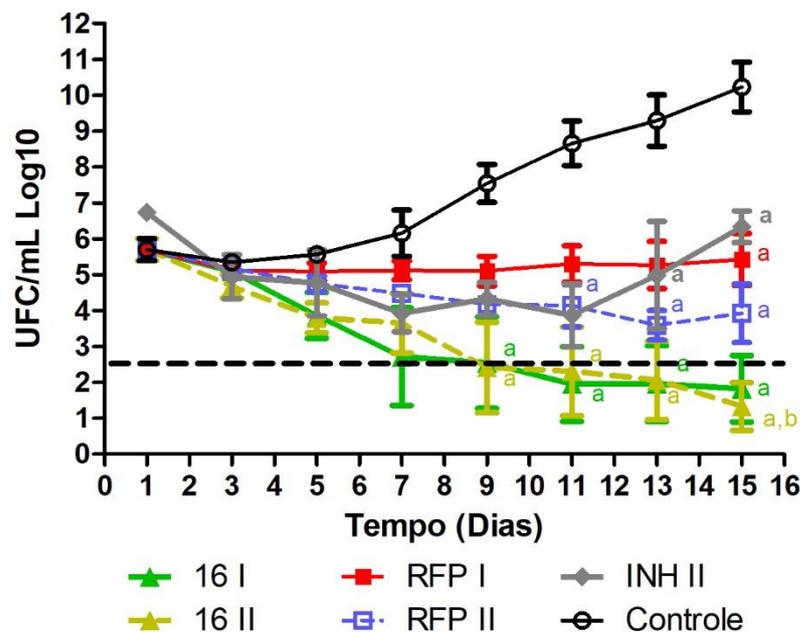


Gráfico 5. Cinética bacteriana da hidrazona 16 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$); b= contagem bacteriana estatisticamente diferente da INH no mesmo dia ($p < 0,05$). I= Concentração igual a 1x CIM₉₀ e II= Concentração igual a 2x CIM₉₀. Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independente.

A melhor atividade no ensaio de cinética foi a apresentada pela hidrazona 16 (gráfico 5) que conseguiu promover a diminuição do inóculo bacteriano em 3 logs já no 9º dia de tratamento em seus valores de CIM₉₀ e 2x CIM₉₀, demonstrando um perfil bactericida frente o *M. tuberculosis*.

As concentrações testadas foram de 1,8 $\mu\text{g/mL}$ (16 I) e 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (16 II).

A diminuição da concentração bacilar começou a se diferenciar do controle também a partir do 9º dia de tratamento e acreditamos que, provavelmente, chegaria a uma esterilização do inóculo se o experimento continuasse por mais alguns dias, já que é possível observar um decaimento gradual e contínuo na curva de crescimento.

Observando as curvas de crescimento apresentadas pelos controles RFP e INH podemos dizer que a hidrazona 16 apresenta melhor atividade contra o *M. tuberculosis*, *in vitro*, do que os fármacos utilizados no tratamento preconizado, mesmo que a diferença estatística tenha aparecido apenas no 15º dia, com relação a INH.

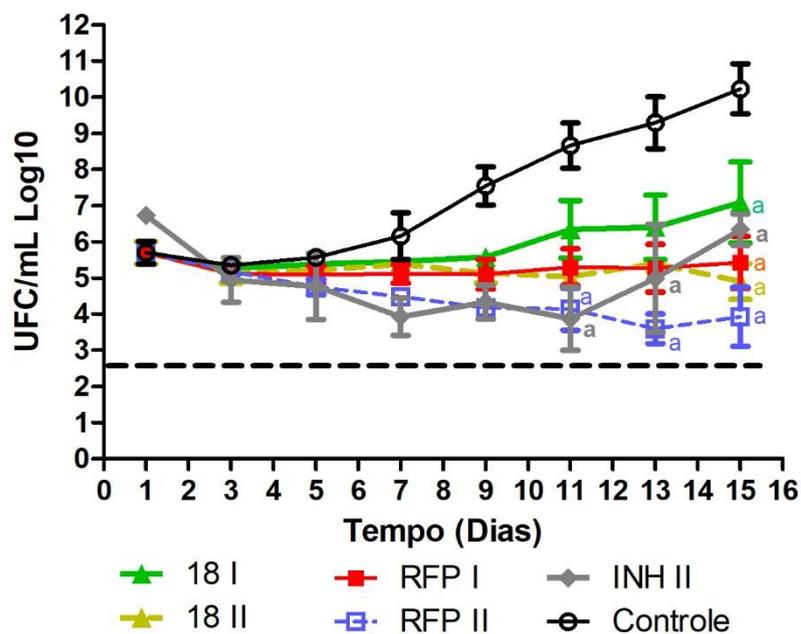


Gráfico 6. Cinética bacteriana da hidrazona 18 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$). I= Concentração igual a 1x CIM₉₀ e II= Concentração igual a 2x CIM₉₀. Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independente.

No gráfico 6 é apresentado o resultado da cinética da hidrazona 18, que foi a que menos inibiu o crescimento do *M. tuberculosis*, se comparada aos resultados das hidrazonas 14, 15 e 16 e aos fármacos padrão.

Assim como a hidrazona 15, a diferença estatística com relação ao controle apareceu apenas no 15º dia de tratamento em ambas concentrações testadas, que foram de 5,3 $\mu\text{g/mL}$ para 18 I e 10,5 $\mu\text{g/mL}$ para 18 II, respectivamente.

Esse perfil apresentado pela hidrazona 18 não foi satisfatório e, associando essa atividade com seus baixos IS, acreditamos que essa molécula não seria adequada ao tratamento da TB.

4.5. Atividade intramacrofágica

Nos gráficos a seguir são apresentados os resultados obtidos no ensaio de atividade intramacrofágica, no qual pôde-se avaliar o potencial de cada hidrazona em inibir o crescimento do *M. tuberculosis* dentro dos macrófagos.

Para a hidrazona 14 as concentrações utilizadas no ensaio foram de 0,35 µg/mL, valor de sua CIM, e 5x e 10x o valor da CIM. Como controle, a RFP acompanhou a hidrazona 14, sendo avaliada no valor de 1x, 5x e 10x a CIM.

Utilizamos estas concentrações apenas para essa hidrazona, pois a mesma apresentou altos índices de seletividade frente as células macrofágicas.

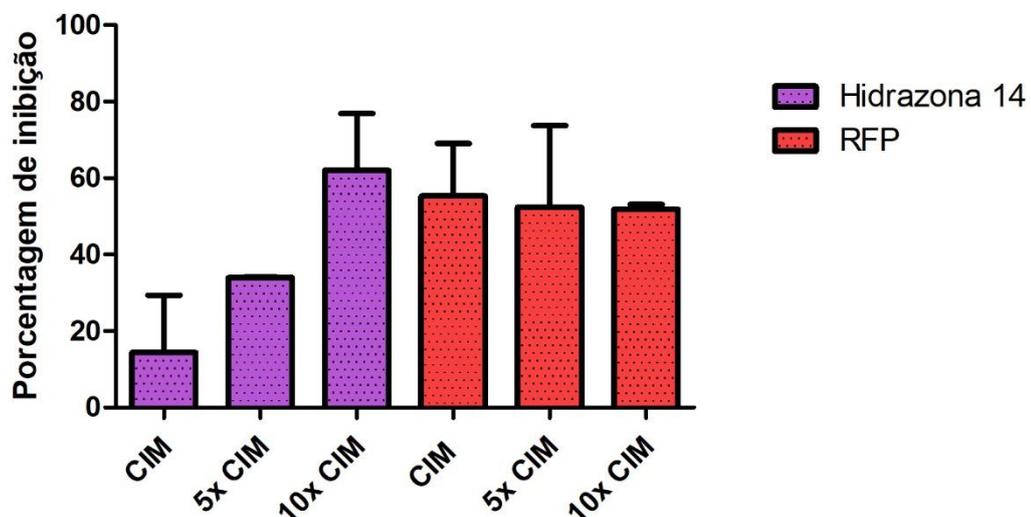


Gráfico 7. Atividade intramacrofágica da hidrazona 14 ($CIM_{90} = 0,35 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.

Quanto a atividade apresentada, a hidrazona 14 demonstrou aumento em seu potencial inibitório de maneira proporcional ao aumento da sua concentração, com inibição de aproximadamente 15% no valor de sua CIM e de 35% e 65% quando em 5x e 10x sua CIM, respectivamente.

Diferente do perfil apresentado pela hidrazona, a RFP age de maneira uniforme ao inibir o crescimento das micobactérias fagocitadas, mantendo a porcentagem de inibição em torno de 60% já no valor de sua CIM, de 0,04 $\mu\text{g/mL}$.

Devido a este resultado obtido e sabendo da não toxicidade da hidrazona 14, decidimos realizar novo ensaio afim de verificar a atividade da molécula em maiores concentrações. Assim foram utilizadas concentrações de 20, 50 e 100x a CIM obtida para a hidrazona 14 e também para RFP.

Os resultados foram unidos no gráfico 8 apresentado a seguir.

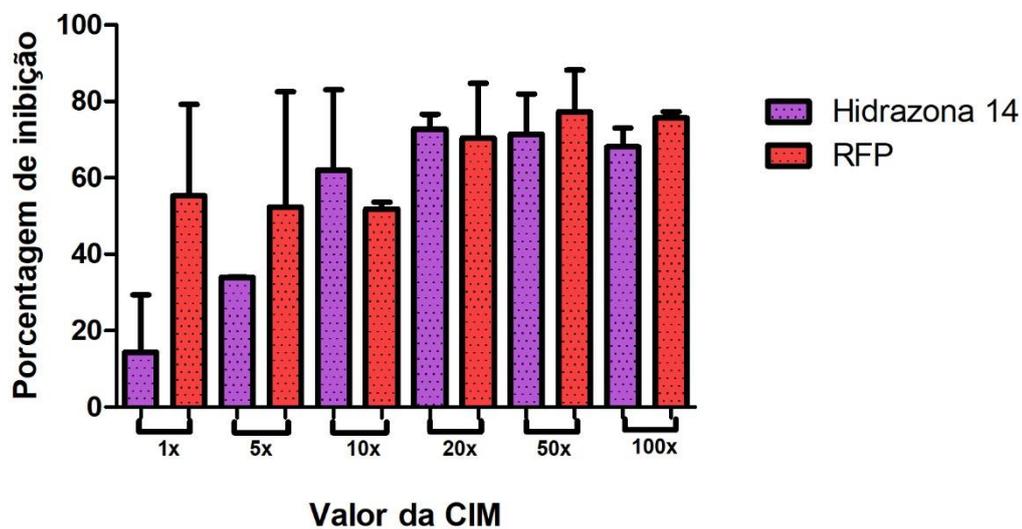


Gráfico 8. Atividade intramacrofágica da hidrazona 14 em maiores concentrações ($\text{CIM}_{90} = 0,35 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.

Nessas maiores concentrações é possível observar um aumento da atividade. Quando a concentração é 20x a CIM_{90} , a inibição do crescimento bacilar chega a 70% e, após esta concentração, ocorre uma estabilização da atividade, permanecendo em torno de 70% quando 50 e 100x maior que o valor da CIM_{90} . Provavelmente, nessas concentrações maiores, há uma saturação do alvo farmacológico da hidrazona 14 e, por isso, há uma manutenção da resposta mesmo com o aumento da concentração.

Com a RFP não ocorrem mudanças tão significativas no perfil de inibição quanto o demonstrado pela hidrazona 14, já que a inibição começa em 60%, quando no valor da CIM, e sobe para 75% quando em 100x a CIM.

Para a hidrazona 15 não foi viável a realização do ensaio de atividade intramacrofágica já que, no ensaio de citotoxicidade, após 72 h de exposição, a concentração citotóxica (IC_{50}) para 50 % do inóculo de macrófagos foi igual a $1,0 \mu\text{g/mL}$ e a CIM_{90} para a hidrazona 15 é de $11,9 \mu\text{g/mL}$. Dessa forma, não existe a possibilidade de sobrevivência celular na mínima concentração necessária para a inibição do crescimento das micobactérias e, por isso, o teste não foi realizado.

Para a hidrazona 16 as concentrações testadas foram iguais ao valor de sua CIM_{90} e $CIM_{90/4}$ e $CIM_{90 \times 4}$, com valores de 2,0, 0,5 e $8,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A atividade intramacrofágica da hidrazona 16 foi menos evidente quando comparamos à hidrazona 14, sendo a 16 a que apresentou a menor atividade mesmo quando numa concentração 4x maior que sua CIM, inibindo o crescimento do *M. tuberculosis* em apenas 10% no valor da CIM.

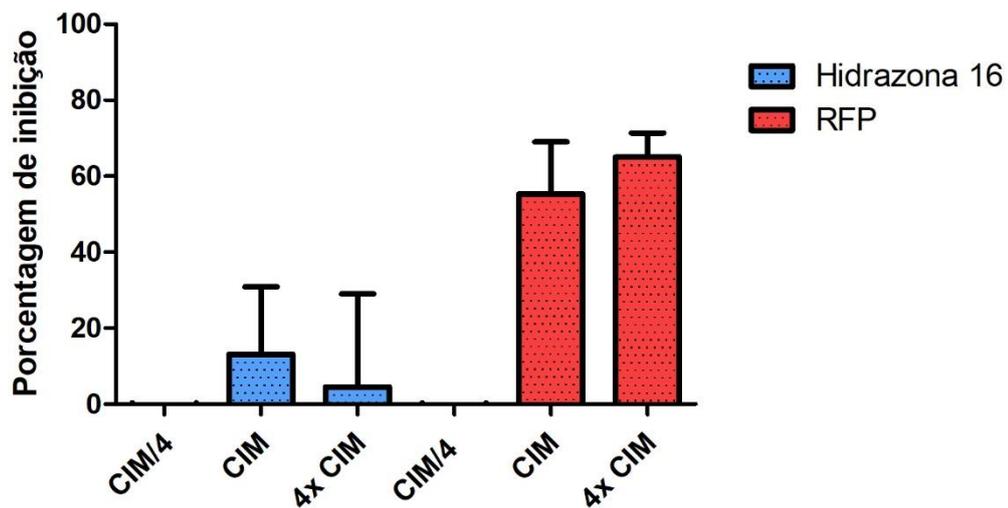


Gráfico 9. Atividade intramacrofágica da hidrazona 16 ($CIM_{90} = 1,82 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.

Esse resultado da hidrazona 16 não era esperado devido a sua excelente atividade frente o bacilo, principalmente por seu potencial bactericida. Porém, não devemos nos esquecer que essa molécula também é ativa frente o *M. tuberculosis* não-replicante e, por isso, esse resultado não limita o potencial dessa hidrazona como novo fármaco para o tratamento.

Para a hidrazona 18 os valores testados foram de 5,3 e $1,3 \mu\text{g/mL}$, ou seja, o valor de sua CIM_{90} e $CIM_{90/4}$, respectivamente. Foram testadas apenas essas concentrações devido a toxicidade apresentada por essa molécula frente a linhagem de macrófagos J774A.1 após 72h, resultados apresentados anteriormente.

Como podemos observar no gráfico 10 abaixo, a hidrazona 18 não apresentou eficiente atividade intramacrofágica, não sendo efetiva na eliminação dos bacilos nesta condição.

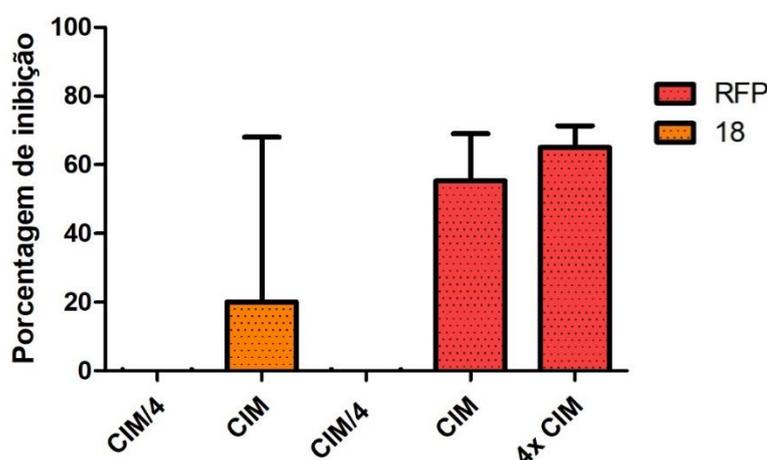


Gráfico 10. Atividade intramacrofágica da hidrazona 18 ($CIM_{90} = 5,30 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.

4.6. Determinação do composto líder

Neste momento, é apresentado na Tabela 5 abaixo um resumo das atividades apresentadas em todos os testes realizados com as hidrazonas. Essa avaliação é necessária para que se proceda a determinação do composto líder com a qual serão realizados os experimentos para descoberta do possível mecanismo de ação.

Tabela 5. Resumo geral da atividade das hidrazonas em todos testes executados.

Avaliação da atividade	Hidrazonas			
	14	15	16	18
$CIM_{90} \text{ REMA} < 10 \mu\text{g/mL}$	✓	×	✓	✓
$CIM_{90} \text{ LORA} < 10 \mu\text{g/mL}$	✓	✓	✓	✓
$IC_{50} > 10 \text{ MRC-5 (24h)}$	✓	×	✓	×
$IC_{50} > 10 \text{ J774A.1 (72h)}$	✓	×	✓	×
Atividade Intramacrofágica*	✓	×	×	×
Atividade bactericida	✓	×	✓	×
Atividade bacteriostática	×	✓	×	✓
Estreito espectro de atividade	✓	✓	✓	✓

*Atividade intramacrofágica comparável à RFP.

Foram pontos determinantes para essa escolha os valores de CIM_{90} , que deveriam ser menores que $10 \mu\text{g/mL}$ e os valores de IS, que devem ser maiores ou iguais a 10. Além desses

pontos, é importante que a hidrazona seja ativa frente ao bacilo nas diferentes condições metabólicas, no estado não-replicante e intramacrofágico.

Dessa forma, podemos concluir que a hidrazona 14 é a que apresentou atividade em todas as condições testadas, além de não apresentar toxicidade frente as células eucarióticas sendo, portanto, a hidrazona líder escolhida para avaliação do possível mecanismo de ação.

4.7. Resultado da avaliação da inibição da síntese de ácidos micólicos – CCD

Na Figura 10 é apresentada a cromatografia em camada delgada obtida após tratamento de culturas de *M. tuberculosis* e extração de ácidos micólicos. Foram testados, da esquerda para a direita, padrão de ácidos micólicos, RFP, INH, ETA, ETH, controle não tratado e hidrazona 14.

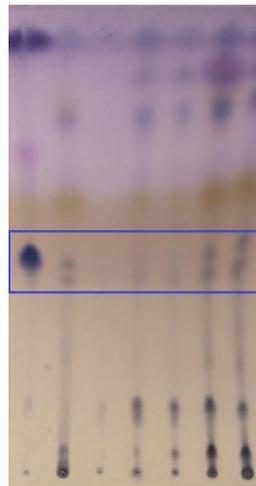


Figura 10. Cromatoplaça (sílica gel) dos ácidos micólicos extraídos após tratamento. Da esquerda para direita: padrão, RFP, INH, ETA, ETH, controle não tratado e hidrazona 14. FM: hexano:éter etílico:ácido acético (60:38:02). Revelador: anisaldeído sulfúrico (110 °C por 10 min). Fonte: autor.

Para o tratamento das culturas foram utilizadas concentrações dos fármacos em 2x CIM₉₀ pois, em experimentos anteriores, não foi possível observar a inibição da síntese dos ácidos micólicos em culturas tratadas com os fármacos inibidores, INH, ETA e ETH.

Os valores de CIM₉₀ da RFP, INH e da hidrazona 14 foram determinados pelo ensaio do REMA. Para os compostos ETH e ETA foram utilizados valores de CIM₉₀ encontrados na literatura, respectivamente 0,5 e 0,25 µg/mL (ALLIANCE et al., 2008).

A distância de eluição foi de 9 cm e, dessa forma, o fator de retenção (Rf) do padrão foi igual a 0,47 para a mancha superior e 0,44 para a inferior. Essas manchas indicam uma separação entre os ácidos micólicos extraídos, resultado já esperado (JYOTI et al., 2015).

Podemos observar de maneira clara o aparecimento de manchas com Rf iguais ao padrão nas amostras de RFP, controle positivo e hidrazona 14.

Para INH, não houve aparecimento de mancha e para as amostras ETH e ETA as manchas apareceram bem mais claras do que as apresentadas pela RFP, controle e hidrazona.

Essa menor concentração de ácidos micólicos aparentes na CCD para os tratamentos com ETA e ETH se devem ao fato de que as concentrações utilizadas se basearam na CIM₉₀ encontrada na literatura e não em um resultado experimental. Assim, provavelmente a CIM₉₀ experimental poderia ser pouco maior, levando à total inibição da síntese dos ácidos micólicos, resultado esperado para estes antimicrobianos.

Finalmente, através do aparecimento de mancha coincidente com o padrão na amostra da hidrazona 14, podemos concluir que esta hidrazona não é capaz de inibir efetivamente a síntese de ácidos micólicos da parede do *M. tuberculosis*.

Há ainda a possibilidade de que a hidrazona 14 seja capaz de diminuir a síntese desses ácidos graxos. Porém, por este ser um método qualitativo e não quantitativo, não é possível determinar se houve ou não esta diminuição. Ainda assim, é uma metodologia eficaz para se evidenciar o mecanismo de ação principal de um composto.

Este resultado está de acordo com o esperado, já que compostos inibidores da síntese dos ácidos micólicos não são capazes de agir na inibição do crescimento bacteriano em estado não-replicante, como previamente comentado.

Dessa forma, podemos excluir o mecanismo de ação relacionado à inibição da síntese de ácidos micólicos, alvo de ação da INH, o protótipo para a síntese dessas hidrazonas.

4.8. Resultado da avaliação da inibição de bombas de efluxo

No gráfico 11 são apresentadas curvas analíticas relativas a fluorescência intracelular do brometo de etídio com relação ao tempo em *M. tuberculosis*. Foram utilizados no teste a hidrazona 14 e verapamil, ambos em concentração igual a ½ CIM₉₀ e como controle, *M. tuberculosis* não tratado.

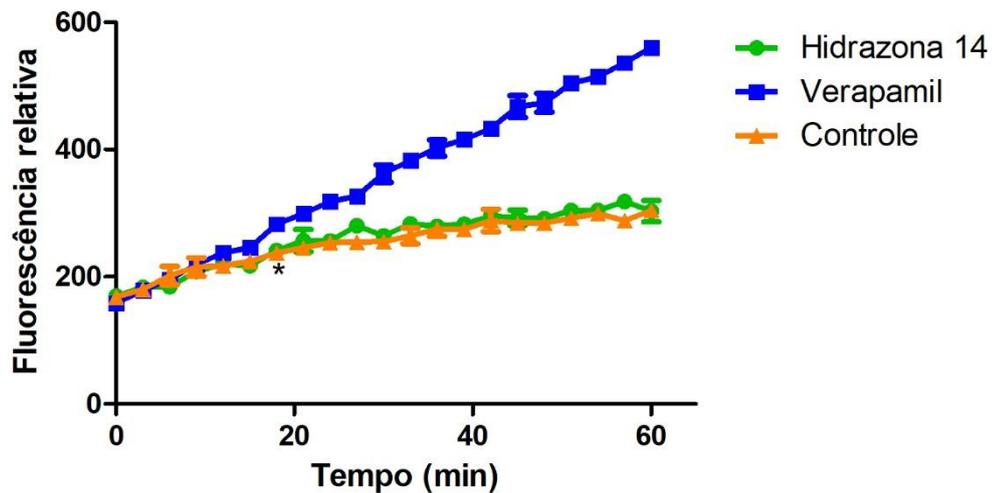


Gráfico 11. Gráfico da fluorescência relativa do brometo de etídio com relação ao tempo para avaliação da atividade com relação a inibição de bombas de efluxo. *= momento em que se inicia a diferença estatística significativa do controle e da hidrazona 14 com relação ao verapamil (18min). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de triplicata técnica.

Também foram realizados outros controles, não apresentados no gráfico, verificando a fluorescência emitida pelo PBS, PBS + BrEt, PBS + BrEt + verapamil e PBS + bactéria.

O verapamil, conhecido fármaco inibidor de canais de cálcio em células eucarióticas, também possui a capacidade de inibir a atividade das bombas de efluxo presentes na membrana do *M. tuberculosis*, dessa forma, promovendo um aumento gradativo da fluorescência intracelular por aumento da concentração de BrEt (MACHADO et al., 2016).

Estatisticamente, a partir de 18 minutos, já é possível verificar diferença significativa entre a fluorescência do verapamil e o controle não tratado, demonstrando assim a eficiência deste fármaco em inibir as bombas de efluxo e assim aumentar a concentração de brometo intracelular.

Comparando-se as curvas obtidas, podemos observar que não houve diferença estatística entre as curvas do controle e da hidrazona 14, determinando assim que o composto não possui atividade frente as bombas de efluxo de *M. tuberculosis*.

Assim, mais um dos possíveis mecanismos de ação é excluído do conjunto de possibilidades, afunilando-se assim, as possibilidades.

4.9. Resultado da avaliação da inibição da síntese de proteínas

A Tabela 6 a seguir apresenta os resultados obtidos no ensaio de REMA para determinação da CIM₉₀ frente a *M. smegmatis*.

Tabela 6. Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas de *M. smegmatis* mc²155 (ATCC 700084). Valores apresentados como média (M) ± desvio padrão (DP) de três ensaios independentes.

Compostos	CIM ₉₀ (µg/mL)
Hidrazona 14	> 25,0
RFP	2,4 ± 1,5
INH	4,7 ± 0,9

Como podemos observar, a hidrazona 14 apresenta um valor de CIM₉₀ superior a 25 µg/mL, maior concentração utilizada no experimento. Devido a isso, não foi possível realizar o ensaio para possível determinação do mecanismo de ação relacionado à inibição da síntese de proteínas com a utilização de fagos D29.

Contudo, posteriormente, o ensaio será deverá ser realizado utilizando-se cepa padrão de *M. tuberculosis*, já que frente esta espécie a hidrazona 14 foi ativa.

Porém, por meio desta análise, podemos sugerir que o alvo de inibição apresentado pela hidrazona 14 é específico para o *M. tuberculosis*, como ocorre com a capreomicina, por exemplo.

A capreomicina, inibidora da síntese de proteínas que apresenta estreito espectro de atividade, inibe a porção 16S do ribossomo micobacteriano. Essa estrutura é amplamente conservada na maioria das espécies bacterianas, porém, seu espectro de ação é estreito devido à presença do gene *tlyA* no *M. tuberculosis*. Este gene está associado à metilações específicas no ribossomo e, essas alterações estruturais permitem a ligação da capreomicina e a inibição da síntese de proteínas e, devido à ausência deste gene em outras espécies, a capreomicina se torna menos eficiente (JOHANSEN et al., 2006).

Dessa forma, não excluimos a inibição da síntese de proteínas como possível mecanismo de ação para a hidrazona 14.

5. CONCLUSÃO

A Tuberculose continua, a cada dia, provocando mortes ao redor de todo o mundo. Seu tratamento, apesar de efetivo, apresenta-se obsoleto frente às cepas resistentes e pode ser melhorado através do estudo de novos compostos e neste trabalho avaliamos a atividade das hidrazonas, compostos inovadores, sintetizados com base na estrutura química da isoniazida.

Após as análises iniciais, conseguimos verificar que todas essas hidrazonas apresentam atividade inibitória frente o *Mycobacterium tuberculosis* em seus dois principais estados metabólicos: replicante e não-replicante. Essa característica absolutamente vantajosa já nos dava indícios do potencial desses compostos, que foram capazes de inibir o bacilo de forma mais satisfatória que a INH, incapaz de inibir a bactéria não-replicante.

Após a avaliação da citotoxicidade e cálculo do IS pudemos determinar que as hidrazonas de número 14 e 16 seriam as mais promissoras do grupo, por apresentarem valores de IS > 10 e, ainda, efeito bactericida frente à micobactéria e estreito espectro de atividade.

Já frente as bactérias intramacrofágicas, a hidrazona 14 despontou, apresentando atividade similar à RFP, o que foi decisivo para que esta hidrazona fosse escolhida como composto líder e, assim, foi avaliada em seu mecanismo de ação.

Dessa forma, avaliamos a capacidade da hidrazona 14 em inibir o funcionamento das bombas de efluxo e a síntese dos ácidos micólicos e, em ambas metodologias, não encontramos resultados positivos da inibição.

Também realizamos avaliação da atividade inibitória da hidrazona 14 frente à cepa de *Mycobacterium smegmatis* para, posteriormente, avaliar sua capacidade em inibir a síntese de proteínas. Entretanto, esse composto não foi ativo, e o ensaio não pôde ser realizado.

Dessa forma, concluimos que a hidrazona 14 é um composto inovador, de excelente atividade antimicobacteriana, que apresenta um novo mecanismo de ação, diferente do apresentado pela INH e que supostamente age em estrutura exclusiva apresentada pelo *M. tuberculosis*, isso porque seu espectro de ação é estreito, não atuando inclusive frente à *M. smegmatis*, sendo seu alvo molecular uma estrutura não conservada entre as espécies bacterianas.

REFERÊNCIAS

- ALLIANCE, G.; DEVELOPMENT, T. B. D.; STREET, B.; YORK, N. Handbook of anti-tuberculosis agents. Introduction. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 88, n. 2, p. 85–86, 2008.
- 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.
- BALGANESH, M.; DINESH, N.; SHARMA, S.; KURUPPATH, S.; NAIR, A. V.; SHARMA, U. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2643–2651, 2012.
- BELISLE, J. T.; VISSA, V. D.; SIEVERT, T.; TAKAYAMA, K.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**, v. 276, n. 5317, p. 1420–1422, 1997.
- BERALDO, A. A.; ANDRADE, R. L. de P.; ORFÃO, N. H.; SILVA-SOBRINHO, R. A. da; PINTO, É. S. G.; WYSOCKI, A. D.; BRUNELLO, M. E. F.; MONROE, A. A.; SCATENA, L. M.; VILLA, T. C. S. Adherence to tuberculosis treatment in Primary Health Care: perception of patients and professionals in a large municipality. **Escola Anna Nery**, v. 21, n. 4, p. 1–8, 2017.
- BHAT, Z. S.; RATHER, M. A.; MAQBOOL, M.; LAH, H. U.; YOUSUF, S. K.; AHMAD, Z. Cell wall: A versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 1520–1534, 2017.
- BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015.
- 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.
- CHAMBERLAIN, P. D.; SADAKA, A.; BERRY, S.; LEE, A. G. Ethambutol optic neuropathy. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 28, n. 6, p. 545–551, 2017.
- CHINTA, K. C.; SAINI, V.; GLASGOW, J. N.; MAZORODZE, J. H.; RAHMAN, M. A.;

REDDY, D.; LANCASTER, J. R.; STEYN, A. J. C. The emerging role of gasotransmitters in the pathogenesis of tuberculosis. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 59, p. 28–41, 2016.

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.

DA SILVA, P. B.; CAMPOS, D. L.; RIBEIRO, C. M.; DA SILVA, I. C.; PAVAN, F. R. New antimycobacterial agents in the pre-clinical phase or beyond: recent advances in patent literature (2001–2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 3, p. 269–282, 2017.

DA SILVA, P. E. A.; VON GROLL, A.; MARTIN, A.; PALOMINO, J. C. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–9, 2011.

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.

DE KNEGT, G. J.; VAN DER MEIJDEN, A.; DE VOGEL, C. P.; AARNOUTSE, R. E.; DE STEENWINKEL, J. E. M. Activity of moxifloxacin and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis* in combination with potentiator drugs verapamil, timcodar, colistin and SQ109. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 3, p. 302–307, 2017.

DE STEENWINKEL, J. E. M.; DE KNEGT, G. J.; TEN KATE, M. T.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M. Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2582–2589, 2010.

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.

DIAS-FREEDMAN, I.; CHEN, C.; DIETZOLD, J.; DAUDELIN, I.; KAYA, F. crossm Ethambutol Partitioning in Tuberculous Efficacy. v. 61, n. 9, p. 1–12, 2017.

DOS SANTOS FERNANDES, G. F.; DE SOUZA, P. C.; MORENO-VIGURI, E.; SANTIVANEZ-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.
FERRARESI-CUROTTO, V.; ECHEVERRÍA, G. A.; PIRO, O. E.; PIS-DIEZ, R.; GONZÁLEZ-BARÓ, A. C. Synthesis and characterization of a series of isoniazid hydrazones. Spectroscopic and theoretical study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1133, p. 436–447, 2017.

FIELD, S. K. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Great promise or disappointment? **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 6, n. 4, p. 170–184, 2015.
GRAMEC, D.; MAŠI, L. P.; DOLENC, M. S. Bioactivation Potential of Thiophene Containing Drugs Bioactivation Potential of Thiophene Containing Drugs. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 1344–1348, 2014.

GUO, H. li; HASSAN, H. M.; DING, P. ping; WANG, S. jie; CHEN, X.; WANG, T.; SUN, L. xin; ZHANG, L. yong; JIANG, Z. zhou. Pyrazinamide-induced hepatotoxicity is alleviated by 4-PBA via inhibition of the PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway. **Toxicology**, v. 378, n. 17, p. 65–75, 2017.

HU, Y. Q.; ZHANG, S.; ZHAO, F.; GAO, C.; FENG, L. S.; LV, Z. S.; XU, Z.; WU, X. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 133, p. 255–267, 2017.

JANKUTE, M.; COX, J. A. G.; HARRISON, J.; BESRA, G. S. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 405–423, 2015.

JOHANSEN, S. K.; MAUS, C. E.; PLIKAYTIS, B. B.; DOUTHWAITE, S. Capreomycin Binds across the Ribosomal Subunit Interface Using tlyA -Encoded 2'-O-Methylations in 16S and 23S rRNAs. p. 173–182, 2006.

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.

KARTHIK, K.; MUNESWARAN, N. S.; MANJUNATHACHAR, H. V. Bacteriophages : Effective Alternative to Antibiotics. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1–7, 2014.

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

LARSEN, E. M.; STEPHENS, D. C.; CLARKE, N. H.; JOHNSON, R. J. Ester-prodrugs of ethambutol control its antibacterial activity and provide rapid screening for mycobacterial hydrolase activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 19, p. 4544–4547, 2017.

LEE, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 78, n. 2, p. 47–55, 2015.

LIANG, Y.; ZHU, L.; GAO, M.; ZHENG, Z.; WU, J.; ZHAN, X. Influence of Tween-80 on the production and structure of water-insoluble curdlan from *Agrobacterium* sp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 611–619, 2018.

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.

MASAKI, S.; SUGIMORI, G.; OKAMOTO, A.; IMOSE, J.; HAYASHI, Y. Effect of Tween 80 on the Growth Mycobacterium avium Complex. **Journal of Microbiology and Immunology**, v. 34, n. 8, p. 653–663, 1990.

MC, S.; STRAINS, I. R. M. Complete Genome Sequences of a Mycobacterium smegmatis Laboratory. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, p. 1–2, 2015.

MIGLIORI, G. B.; LODDENKEMPER, R.; BLASI, F.; RAVIGLIONE, M. C. 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.; PONTALI, E.; SOTGIU, G.; CENTIS, R.; D'AMBROSIO, L.; TIBERI, S.; TADOLINI, M.; ESPOSITO, S. Combined use of delamanid and bedaquiline to treat multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: A systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 341, 2017.

MIOTTO, P.; TESSEMA, B.; TAGLIANI, E CHINDELEVITCH, L.; STARKS, A.; EMERSON, C.; HANNA, D.; KIM, P.; LIWSKI, R.; ZIGNOL, M.; GILPIN, C.; NIEMANN, S.; DENKINGER, C.; FLEMING, J.; WARREN, R.; CROOK, D.; POSEY, J.; GAGNEUX, S.; HOFFNER, S.; RODRIGUES, C.; COMAS, I.; ENGELTHALER, D.; MURRAY, M.; ALLAND, D.; RIGOUTS, L.; LANGE, C.; DHEDA, K.; HASAN, R.; RANGANATHAN, UDK MCNERNEY, R.; EZEWUDO, M.; CIRILLO, D.; SCHITO, M.; KÖSER, C.; RODWELL, T. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug-resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Eur Respir J**, v. 50, 2017.

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**. [s.l: s.n.]v. 23, 2005.

NEMETH, J.; OESCH, G.; KUSTER, S. P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 382–395, 2015.

NILLER, H. H.; MASA, R.; VENKEI, A.; MÉSZÁROS, S.; MINAROVITS, J. Pathogenic mechanisms of intracellular bacteria. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 309–315, 2017.

NUNES-ALVES, C.; BOOTY, M. G.; CARPENTER, S. M.; JAYARAMAN, P.; ROTHCHILD, A. C.; BEHAR, S. M. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–299, 2014.

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 Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobail Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 2004.

PARISH, T.; ROBERTS, D. M. Mycobacteria protocols: Third edition. **Mycobacteria Protocols: Third Edition**, v. 1285, p. 1–416, 2015.

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

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. Von; 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, 2010b.

PEDDIREDDY, V.; DODDAM, S. N.; AHMED, N. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–19, 2017.

PICHHOLIYA, M.; YADAV, A.; LUHADIA, S.; TAHASHILDAR, J.; ASERI, M. A comparative study of efficacy and safety of febuxostat and allopurinol in pyrazinamide-induced hyperuricemic tubercular patients. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 522, 2016.

PINHEIRO, M.; SILVA, A. S.; PISCO, S.; REIS, S. Interactions of isoniazid with membrane models: Implications for drug mechanism of action. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 183, p. 184–190, 2014.

PRASAD, R.; SRIVASTAVA, D. K. Multi drug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) management: Current issues. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 1, n. 3, p. 124–128, 2013.

QUIGLEY, J.; HUGHITT, V. K.; VELIKOVSKY, C. A.; MARIUZZA, R. A.; EL-SAYED, N. M.; BRIKEN, V. The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. **mBio**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2017.

RESCH, P.; SCHNEIDER, F. W.; FIELD, R. J.; BURGER, M. The reduction of methylene blue by sulfide ion in the absence and presence of oxygen: Simulation of the methylene blue-O₂-HS--CSTR oscillations. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 42, n. 2, p. 189–200, 1990.

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.

SCHOREY, J. S.; SCHLESINGER, L. S. Innate Immune Responses to Tuberculosis. p. 1–27, 2016.

SHEEN, P.; LOZANO, K.; GILMAN, R. H.; VALENCIA, H. J.; LOLI, S.; FUENTES, P.; GRANDJEAN, L.; ZIMIC, M. PncA gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 93, n. 5, p. 515–522, 2013.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

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.

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

TURNER, R. D.; CHIU, C.; CHURCHYARD, G. J.; ESMAIL, H.; LEWINSOHN, D. M.; GANDHI, N. R.; FENNELLY, K. P. Tuberculosis Infectiousness and Host Susceptibility. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. S6, p. S636–S643, 2017.

VAN BAMBEKE, F. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on

resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1055–1065, 2003.

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.; PARISH, T.; ROBERTS, D. M.; GILL, W. P.; HARIK, N. S.; WHIDDON, M. R.; LIAO, R. P.; MITTLER, J. E.; SHERMAN, D. R. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Medicine**, v. 15, n. 2, p. 252–275, 2009.

VOSKUIL, M. I.; SCHNAPPINGER, D.; VISCONTI, K. C.; HARRELL, M. I.; DOLGANOV, G. M.; SHERMAN, D. R.; SCHOOLNIK, G. K. Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 5, p. 705–713, 2003.

WAYNE, L. G. In Vitro Model of Hypoxically Induced Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in molecular medicine**, v. 54, p. 247–269, 2001.

WAYNE, L. G.; SOHASKEY, C. D. NONREPLICATING PERSISTENCE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS *. 2001.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by Isoniazid of Synthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of General Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 41–48, 1970.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis**. [s.l: s.n.], p. 1-464, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2017**. [s.l: s.n.], p.1-262, 2017.

ZUIGA, J.; TORRES-GARCÍA, D.; SANTOS-MENDOZA, T.; RODRIGUEZ-REYNA, T. S.; GRANADOS, J.; YUNIS, E. J. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

Capítulo II

Artigos publicados durante o Mestrado:

1. COIMBRA, E. S.; SANTOS, J. A.; LIMA, L. L.; MACHADO, P. A.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. R.; SILVA, A. D. Synthesis, antitubercular and leishmanicidal evaluation of resveratrol analogues. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 12, p. 2161–2169, 2016.
2. DA SILVA, P. B.; CAMPOS, D. L.; RIBEIRO, C. M.; DA SILVA, I. C.; PAVAN, F. R. New antimycobacterial agents in the pre-clinical phase or beyond: recent advances in patent literature (2001–2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 3, p. 269–282, 2017.
3. DE CASTRO, P. P.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. R.; AMARANTE, G. W. Dual-protected amino acid derivatives as new antitubercular agents. **Chemical biology & drug design**, p. 0–3, 2018.
4. PAIXÃO, D. A.; MARZANO, I. M.; JAIMES, E. H. L.; PIVATTO, M.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. R.; DEFLON, V. M.; MAIA, P. I. da S.; DA COSTA FERREIRA, A. M.; UEHARA, I. A.; SILVA, M. J. B.; BOTELHO, F. V.; PEREIRA-MAIA, E. C.; GUILARDI, S.; GUERRA, W. Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, p. 138–146, 2017.
5. POLAQUINI, C. R.; TORREZAN, G. S.; SANTOS, V. R.; NAZARÉ, A. C.; CAMPOS, D. L.; ALMEIDA, L. A.; SILVA, I. C.; FERREIRA, H.; PAVAN, F. R.; DUQUE, C.; REGASINI, L. O. Antibacterial & antitubercular activities of cinnamylideneacetophenones. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1–12, 2017.
6. SATO, M. R.; OSHIRO JUNIOR, J. A.; MACHADO, R. T.; SOUZA, P. C. de; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F.; SILVA, P. B. da; CHORILLI, M. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper (II) complexes to be used against Mycobacterium tuberculosis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 909–921, 2017.