

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA**

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO RÁPIDA DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DO
AGENTE DA TUBERCULOSE ÀS DROGAS SINTÉTICAS OU
EXTRATOS VEGETAIS EMPREGANDO *Mycobacterium
tuberculosis* CONTENDO O GENE DA LUCIFERASE**

DAISY NAKAMURA SATO

Tese apresentada ao Instituto de Química,
UNESP/Araraquara, para obtenção do título de
Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, Área de Concentração:
Biotecnologia.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite

ARARAQUARA – SP
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

S253a Sato, Daisy Nakamura
Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase / Daisy Nakamura Sato. -- Araraquara : [s.n.], 2003
76 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientadora: Clarice Queico Fujimura Leite

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Bioluminescência. 3. Macrófagos.
4. Micobactérias. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite
Faculdade de Ciências Farmacêutica - UNESP - Araraquara

Prof^a. Dr^a. Lucilaine Ferrazoli
Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

Prof. Dr. Carmo Elias Andrade Melles
Instituto Adolfo Lutz - São Paulo

Prof. Dr. Wagner Vilegas
Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. Antonio Carlos Massabini
Instituto de Química – UNESP - Araraquara

Trabalho realizado na
Disciplina de Microbiologia,
Departamento de Ciências
Biológicas-UNESP, *Campus* de
Araraquara, no **Instituto
Adolfo Lutz**, Laboratório de
Ribeirão Preto e no **Institute
for Tuberculosis Research**,
College of Pharmacy, University
of Illinois at Chicago.

**Felicidade é um fruto que se colhe
da felicidade que se semeia.**

André Luiz

**Aos meus pais Yatisuque e Júlia,
pelo carinho, amor e dedicação.**

**À minha irmã Meire,
pelo amor, carinho e incentivo.**

**Ao Yasuo, pelo amor, carinho,
incentivo, companheirismo
e compreensão.**

**À Leticia e Felipe,
pelo carinho e compreensão
por tanta ausência.**

**Agradecimentos especiais
à Prof^a. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite
por sua valiosa orientação, mas sobretudo,
por seu carinho, amizade e atenção.**

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao Dr. Scott Gary Franzblau, diretor do Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, EUA, pelo carinho, atenção, assessoria técnica e por acreditar em nosso trabalho.
- ❖ À Wilma Delphina de Oliveira Garotti “in memoriam” e à Suzel Nogueira Neme, Diretoras Técnicas do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto, por permitir o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Micobactérias e pela colaboração e apoio na realização do mesmo.
- ❖ À Prof^a Dr^a Rosimeire C. L. R. Pietro, do Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Ribeirão Preto, pelo incentivo e apoio para a realização deste trabalho e fornecimento dos extratos vegetais.
- ❖ À Prof^a Dr^a Maria Ângela A. Meireles, da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Prof^a Dr^a Elizabeth I. Ferreira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Prof^a Dr^a Lucia M. X. Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara e Prof. Dr. Antonio Carlos Massabini, do Instituto de Química – UNESP, Araraquara, pelo fornecimento dos compostos sintéticos e extratos vegetais.
- ❖ À Coordenadoria do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia pelo empenho, profissionalismo, dedicação e entusiasmo na condução deste curso.
- ❖ Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia – Instituto de Química e Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos valiosos.

- ❖ À Izolina, Sandra e Vilma da secretaria da Pós-graduação em Biotecnologia, pelo carinho, atenção e cordialidade com que sempre me receberam.

- ❖ À Valéria Aparecida Moreira Novelli e Dirce Gonçalves, bibliotecárias da Biblioteca do Instituto de Química – UNESP Araraquara, pelo carinho e atenção na correção das referências bibliográficas e confecção da ficha catalográfica.

- ❖ Aos amigos Cacilda, Clarice, Clóvis, Cristina, Edna, Edilene, Izildinha, Jandira, Lousane, Maria Izilda, Peixoto, Rita, Sebastião, Terezinha e Tuti, do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto, pelo apoio e auxílio técnico durante a realização deste trabalho.

- ❖ Às amigas, Suely, Conceição, Maria Alice, Lucilaine e Carmen, do Setor de Micobactérias, do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central, pelo carinho, incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

- ❖ À Ivone, Marisa, Ednéia, Sílvia e Berna pela amizade, carinho, simpatia e apoio que sempre obtive no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.

- ❖ Por fim a todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XXX
ABSTRACT.....	XXXII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Tratamento da tuberculose pulmonar.....	3
1.2 - Tuberculose Multi-droga resistente.....	5
1.3 - Pesquisa de novas drogas para o tratamento da tuberculose.....	7
1.4. Métodos para a determinação do perfil de sensibilidade.....	9
1.4.1 – Novas metodologias para determinação do perfil de sensibilidade.....	9
1.4.2 – Métodos para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	11
1.4.3 – Técnica da microdiluição em placa utilizando Alamar Blue ou MTT como revelador de crescimento bacteriano.....	12
1.4.4 – Técnicas que utilizam <i>M. tuberculosis</i> contendo o gene da luciferase.....	14
1.4.5 – Avaliação da atividade intracelular.....	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 – Amostras	19
3.2 – Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
3.3 - Cultura de células	22

3.4 - Metodologia.....	22
3.4.1 – Preparo das suspensões bacilares.....	22
3.4.2 - Determinação do perfil de sensibilidade.....	23
3.4.2.1 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica em microplaca utilizando Alamar Blue como revelador (MABA).....	23
3.4.2.2 – Ensaios preliminares para definir parâmetros para o luminômetro SpectraFluor Plus.....	26
3.4.2.3 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica da luciferase utilizando <i>Mycobacterium tuberculosis</i> contendo plasmídio pSMT1.....	26
3.4.2.4 – Determinação do tempo de incubação das micobactérias internalizadas nos macrófagos.....	28
3.4.2.5 – Padronização da técnica da luciferase para determinar a atividade intracelular da rifampicina.....	28
3.4.2.6 – Definição da CIM e da porcentagem de Inibição de crescimento bacteriano	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1 – Avaliação da população bacilar viável nas suspensões bacilares.....	32
4.1.1 – Avaliação da expressão da luciferase pela determinação da URL.....	33
4.2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica em microplaca utilizando o Alamar Blue como revelador	

(MABA).....	34
4.3 – Padronização do tempo de incubação ideal para a realização da leitura em luminômetro.....	35
4.4 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima utilizando <i>M. tuberculosis</i> contendo plasmídeo pSMT1.....	36
4.5 – Comparação entre a técnica do MABA com a da luciferase.....	39
4.6 – Padronização da luciferase intracelular e determinação da atividade intracelular da rifampicina, utilizando macrófagos infectados.....	41
4.7 – Determinação da atividade intracelular de compostos sintéticos e naturais, utilizando macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i> recombinante	42
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8. ANEXOS.....	75

TABELAS

Tabela 1 -	Relação das plantas utilizadas na determinação de atividade antimicobacteriana.....	20
Tabela 2 –	Determinação da CIM da isoniazida, rifampicina e produtos sintéticos, empregando o <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294 pela técnica do MABA.....	34
Tabela 3 -	Determinação da CIM de extratos vegetais, empregando o <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 pela técnica do MABA.....	35
Tabela 4 -	Comparação da CIM da isoniazida e rifampicina pela técnica do MABA e da luciferase, em diferentes períodos de incubação empregando o <i>M. tuberculosis</i> recombinante, contendo o plasmídeo pSMT1.....	36
Tabela 5 -	Determinação da CIM da isoniazida, rifampicina e drogas sintéticas pela técnica da luciferase, empregando o <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 recombinante, contendo o plasmídeo psMT1	37
Tabela 6 -	Determinação da CIM de extratos vegetais pela técnica da luciferase, empregando o <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 recombinante, contendo o plasmídeo pSMT1	38

Tabela 7 - Comparação da CIM da isoniazida, rifampicina e drogas sintéticas obtidas pela técnica do MABA e técnica da luciferase, empregando o <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 contendo o plasmídeo pSMT1.....	39
Tabela 8 - Comparação da CIM de extratos vegetais obtidos pela técnica do MABA e técnica da luciferase, empregando o <i>M tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 recombinante, contendo o plasmídeo pSMT1	40
Tabela 9 – Unidades relativas de Luz (URL) e Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL obtidas após diferentes tempos de incubação das micobactérias com os macrófagos.....	41
Tabela 10 – Resultados de URL e UFC/mL obtidos após diferentes tempos de exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações de rifampicina.....	42
Tabela 11 - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações do produto sintético da Prata denominado de Ag tart.	43
Tabela 12 - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações do produto sintético da estreptomicina denominado de I ₉	43

Tabela 13 - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações dos extratos de <i>Physalis</i> sp e de <i>Dipterix</i> sp.....	44
---	----

ESQUEMAS

- Esquema 1** - Configuração esquemática do preparo da placa para determinação da CIM utilizando Alamar Blue..... 25
- Esquema 2** - Configuração esquemática do preparo da microplaca para a determinação da atividade inibitória intracelular..... 30

FIGURAS

- Figura 1** – Expressão da luciferase em *M. tuberculosis* H37Rv (controle de micobactérias) contendo o plasmídeo pSMT1..... 33
- Figura 2** – Unidades relativas de luz (URL) obtidas após diferentes tempos de exposição dos macrófagos a diferentes concentrações de rifampicina..... 42
- Figura 3** – Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano obtidas após diferentes tempos de exposição dos macrófagos a diferentes concentrações de rifampicina 43

ABREVIATURAS E TERMOS UTILIZADOS

1L a 3L e 6L a 8L – Extratos de *Aristolochia* sp

5L – Extrato de *Olostylis* sp

A1 a A5 – Extratos de *Ocimum* sp

AIDS - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

BACTEC - Método radiométrico para detecção de crescimento bacteriano

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DOTS – Terapia supervisionada diretamente observada

FDA - fluorescein diacetate

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

INH - Isoniazida

MABA – Microplate Alamar Blue Assay

MDR – Multi-droga resistente

Meio 7H9 - Meio líquido de Middlebrook 7H9

MGIT - Mycobacteria Growth Indicator Tube

MTT – Brometo de dimetiltiazoldifeniltetrazolio

RFP - Rifampicina

UFC – Unidade formadora de colônia

URL – Unidade relativa de luz

RESUMO

O aumento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes às drogas utilizadas no esquema de tratamento convencional, principalmente por falha terapêutica, têm levado os pesquisadores à busca de novas drogas. Entretanto, faz-se necessário desenvolver novas metodologias para a determinação da atividade bactericida destes compostos. Este estudo descreve a padronização de uma metodologia rápida para triagem de atividade intra e extracelular de novos compostos, empregando *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 e *Mycobacterium tuberculosis* Erdman ATCC 35801, ambas contendo o plasmídeo pSMT1 com o gene *luxA* e *luxB* proveniente do *Vibrio harveyi*. A rifampicina e a isoniazida foram empregadas como droga de referência na padronização da técnica da luciferase extracelular, obtendo-se resultados de Concentração Inibitória Mínima de 0,03 µg/mL, para ambas as drogas, valores estes compatíveis com os da técnica de Alamar Blue. Para a padronização da técnica da luciferase intracelular foi utilizado o *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT internalizado em células de macrófagos J774. A droga de referência empregada foi a rifampicina obtendo-se um

valor de Concentração Inibitória Mínima de 0,16 µg/mL, compatível com o encontrado na técnica de contagem de unidades formadoras de colônias. Após a padronização das duas metodologias foi avaliada a atividade extracelular de 19 extratos vegetais e 13 derivados sintéticos. Os resultados foram analisados comparativamente com a técnica de Alamar Blue sendo verificada uma similaridade dos resultados entre as duas técnicas. Foi avaliada também a atividade intracelular de 02 extratos vegetais e 02 drogas sintéticas sendo os resultados comparáveis com a técnica de contagem de unidades formadoras de colônias. A concordância dos resultados de Concentração Inibitória Mínima obtida entre a técnica da microdiluição em placa utilizando o corante Alamar Blue como revelador de crescimento bacteriano e a técnica utilizando a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase, a técnica da contagem de unidades formadoras de colônias e a técnica da luciferase intracelular, nos leva a eleger a metodologia bioluminescente como ideal para a triagem rápida de compostos para a avaliação da atividade antimicobacteriana.

ABSTRACT

There has been an increase of *Mycobacterium tuberculosis* strains that are resistant to the current anti-TB agents, mainly through acquired resistance by therapeutic failure. This fact has underscored the need of a quick development of antimycobacterial drugs that are more effective than those currently in use. Moreover, new methodologies to determine the bactericidal activity of these compounds have been proposed. This study describes the use of bioluminescent strains of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – ATCC 27974 and *Mycobacterium tuberculosis* Erdman ATCC 35801 both containing the plasmid pSMT1 constructed with *luxA* and *luxB* genes from *Vibrio harveyi* in a screening to evaluate the antimycobacterial activities of anti-TB agents. Standardization of the technique was performed using isoniazid and rifampicin, as drugs standard. The results of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) were 0.03 µg/mL and 0.03 µg/mL, respectively. These values were totally compatible with those obtained by Microplate Alamar Blue Assay (MABA). Standardization of bioluminescence measurements of intracellular antimycobacterial activity was performed using the J774 murine

macrophage-like cell line infected with *Mycobacterium tuberculosis* Erdman containing the plasmid pSMT1 and rifampicin as a drug standard. The value of MIC was 0.16 µg/mL similar to those obtained by the technique of colony forming unit (CFU). A total of 32 compounds were evaluated, 19 crude plants extracts and 13 synthetic compounds and the values of Minimal Inhibitory Concentration were compared to those obtained with the MABA. Two crude plants extracts and two synthetic compounds were evaluated and the results of MIC and percent of inhibition were compatible with those obtained with the CFU technique. Overall agreements between the MICs obtained by MABA, the results obtained with the luciferase reporter strain of *Mycobacterium tuberculosis*, the results obtained with bioluminescence measurement of intracellular antimycobacterial activity and the CFU technique encouraged us to choice the use of this recombinant mycobacteria in high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*.

1. INTRODUÇÃO

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família *Mycobacteriaceae*, apresentam-se na forma de bacilos curvos ou retos, com 0,2 a 0,7 μm de largura por 1,0 a 10,0 μm de comprimento e possuem a propriedade de álcool-ácido resistência, devido à grande quantidade de lipídeos presentes em sua parede celular. São aeróbias e classificadas de acordo com o seu tempo de crescimento, sendo consideradas de crescimento rápido quando requerem menos de 7 dias para produzir colônias visíveis, e de crescimento lento, aquelas que produzem colônias visíveis após 7 dias de inoculação em meios de cultura sólidos (HOLT *et al.*, 1994; NOLTE & METCHOCK, 1995).

A tuberculose pulmonar é uma doença infecciosa causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *Mycobacterium microti* e *M. canetti*), transmitida de homem a homem por aerossóis produzidos durante a expectoração (AMERICAN THORACIC SOCIETY AND

CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2000), e tem sua magnitude ligada à situação socioeconômica da região ou do país (GERHARDT FILHO & HIJJAR, 1993; RAVIGLIONE *et al.*, 1997). Com o advento da AIDS, a co-infecção HIV/TB tem provocado um impacto na epidemiologia da tuberculose em todo o mundo, fato observado em países desenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente naqueles com altas taxas de infecção pelo HIV. (GARCIA *et al.*, 1994; McMACKEN & CASTRO, 1994; DROBNIIEWSKI *et al.*, 1996; CANTWELL *et al.*, 1994).

Em um levantamento promovido pela Organização Mundial de Saúde, estimou-se que um terço da população mundial estaria infectada pelo *M. tuberculosis*. A incidência de tuberculose está em torno de 8 milhões de novos casos, e 3 milhões de mortes por ano. O mesmo documento indica que 80% dos casos de tuberculose do mundo se concentram em apenas 22 países, e o Brasil é o primeiro na América e o décimo terceiro colocado em número de casos de tuberculose no mundo. Nos países em desenvolvimento a tuberculose ainda é a principal causa de mortes por um agente infeccioso isoladamente (DYE *et al.*, 1999).

A região das Américas alberga 7% do total mundial de casos de tuberculose. No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 129.000 casos novos por ano, dos quais apenas 90.000 casos novos são notificados oficialmente. O Estado de São Paulo, responsável pelo maior número absoluto de casos novos com um coeficiente de incidência de 50/100.000 habitantes e cerca de 1.500 óbitos por ano, notificou 20.125 casos novos no ano de 2001. (BRASIL, 2002; SÃO PAULO, 2002).

O diagnóstico definitivo da tuberculose pulmonar depende do isolamento e identificação do agente etiológico, o *M. tuberculosis*, sendo que as medidas de controle, principalmente no que diz respeito à terapêutica, dependem dos resultados dos testes de sensibilidade aos quimioterápicos utilizados no tratamento. Dessa

maneira, o laboratório tem um papel de extrema importância na quebra da cadeia de transmissão desse agente etiológico e para tal deve estar em constante parceria com o serviço de vigilância epidemiológica local (TENOVER *et al.*, 1993).

1.1 - TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR

O tratamento da tuberculose passou por várias fases até o advento dos novos quimioterápicos utilizados nos esquemas terapêuticos atuais. Desde o aparecimento de drogas que atuam no tratamento da tuberculose como a estreptomicina, descoberta em 1944, e a isoniazida descrita em 1912 e reconhecida como eficaz contra o *M. tuberculosis* somente em 1952, a quimioterapia da tuberculose tem sido modificada no sentido de se buscar a cura para a doença e, dessa maneira, diminuir as taxas de incidência e mortalidade (MELO & AFIUNE, 1993). A partir da década de 60 com a introdução da rifampicina no esquema terapêutico, o sucesso do tratamento tem sido garantido com a utilização do chamado esquema de curta duração, que consiste na associação da isoniazida, pirazinamida e rifampicina (TOMAN, 1979).

No Brasil mais de vinte anos se passaram desde a introdução da quimioterapia de curta duração. No decorrer deste período, algumas modificações tiveram que ser introduzidas nesse esquema no sentido de melhor se adequar à nossa realidade (BRASIL, 1993).

O tratamento da tuberculose pulmonar é feito em nível ambulatorial, onde o paciente é orientado sobre os benefícios do uso regular da medicação, conseqüências que virão, se houver abandono do tratamento e o aparecimento de possíveis efeitos adversos dos medicamentos. Atualmente a estratégia do tratamento supervisionado (DOTS) tem como objetivo garantir sua adesão, reduzindo o risco de transmissão da doença na comunidade. O tratamento supervisionado consiste no acompanhamento da ingestão dos medicamentos na

unidade de saúde ou na residência do paciente. A hospitalização ficaria restrita aos casos especiais, tais como indicações cirúrgicas em decorrência da tuberculose, complicações graves da doença, intolerância medicamentosa incontrolável e em casos sociais, nos quais o paciente não tem residência fixa e, ainda, para grupos especiais que facilmente abandonam o esquema de tratamento (BRASIL, 2002).

O esquema de tratamento preconizado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose, para os casos sem história de tratamento anterior é o Esquema I, que é constituído de duas fases. Na primeira administra-se doses diárias de isoniazida, pirazinamida e rifampicina por dois meses e na segunda fase administra-se isoniazida e rifampicina por quatro meses em doses diárias sempre levando em conta o peso corporal do paciente (BRASIL, 2002). Nos casos de co-infecção HIV/Tuberculose, o uso concomitante de Inibidores da Protease (IP) e/ou Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Nucleosídeos (ITRNN) com a rifampicina, ocorre uma interação farmacológica que reduz significativamente os níveis séricos destes anti-retrovirais. Portanto, nestes casos, esquemas alternativos são propostos, considerando-se a contagem de células T-CD4 e se o paciente é virgem de tratamento para tuberculose (BRASIL, 2001). O Programa propõe ainda outros esquemas terapêuticos de acordo com a situação clínica dos casos. O Esquema IR (Retratamento) é utilizado nos casos de tuberculose pulmonar com história de tratamento anterior (casos de recidiva ou casos de retorno após abandono do Esquema I). O esquema IR é constituído de duas fases. Na primeira são administradas isoniazida, pirazinamida, rifampicina e etambutol por dois meses em doses diárias de acordo com o peso corporal e na segunda fase são administradas isoniazida, rifampicina e etambutol por quatro meses em doses diárias de acordo com o peso corporal. O esquema II é empregado no tratamento de meningite tuberculosa sendo preconizada na primeira fase a administração de doses diárias

durante 2 meses de isoniazida e rifampicina na dosagem de 20 mg/kg de peso e pirazinamida na dosagem de 35 mg/kg de peso independente da idade do paciente. Na segunda fase é recomendada a dosagem de 10 a 20 mg/kg de peso/dia de isoniazida e rifampicina mantida por 7 meses. O esquema III empregado para os casos de falência de tratamento dos Esquemas I e IR, consiste na primeira fase na administração de doses diárias de estreptomicina, etionamida, etambutol e pirazinamida por 3 meses e na segunda fase de doses diárias de etionamida e etambutol durante 9 meses, levando-se em conta o peso corporal do paciente (BRASIL, 2002).

Os quimioterápicos utilizados nos esquemas de tratamento, atuam de maneira diferente, de acordo com a localização dos bacilos. Dessa maneira, no interior dos macrófagos agem melhor as drogas que se difundem para o meio intracelular e que atuam em pH ácido, como a rifampicina, a pirazinamida e o etambutol. Nas lesões fechadas e caseosas, nas quais existe um crescimento bacilar intermitente, a droga mais eficaz e que tem maior rapidez de ação é a rifampicina. A isoniazida também é eficaz, neste caso, porém, sua atuação é mais lenta. A isoniazida, a rifampicina e a estreptomicina são as drogas mais eficazes quando os bacilos se multiplicam nas paredes das cavernas que são formadas a partir da liquefação do material caseoso. Estes parâmetros justificam a preconização do esquema tríplice para o tratamento da tuberculose pulmonar (MITCHISON, 1979).

1.2 – Tuberculose Multi-droga resistente

Apesar da eficácia dos esquemas terapêuticos, nos últimos anos têm-se observado, em nível mundial, um aumento na incidência de tuberculose causada pelo *M. tuberculosis* resistente às principais drogas, o que reflete falhas dos programas de controle da doença. (PABLO-MENDEZ *et al.*, 1998; ESPINAL *et al.*, 2001).

M. tuberculosis pode apresentar resistência natural aos quimioterápicos antes mesmo de ser exposto a estes medicamentos. Tal fato se dá em decorrência de mutações genéticas. (TOMAN, 1979).

A resistência adquirida, que pode ser a um ou mais quimioterápicos é definida como a resistência que se inicia durante o tratamento da tuberculose. Tal fato pode ocorrer pela não aderência do paciente ao esquema terapêutico ou pela falha na prescrição do medicamento (VARELDZIS *et al.*, 1994).

A resistência primária é definida como a resistência a um ou mais quimioterápicos podendo ocorrer em um paciente com tuberculose pulmonar que nunca tenha entrado em contato com as drogas do esquema tríplice, ou seja, ele provavelmente se infectou com bacilos que adquiriram resistência por falência de tratamento (VARELDZIS *et al.*, 1994; MELO & AFIUNE, 1993).

Na literatura internacional, o conceito de tuberculose multi-resistente (MDR), diz respeito a cepas de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida e rifampicina ou mais drogas utilizadas no esquema terapêutico para o tratamento da tuberculose (AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 2003). No Brasil, o conceito de tuberculose multi-resistente (TBMR) se refere aos casos que apresentam falência de tratamento aos esquemas I e III, quando o agente etiológico é resistente à isoniazida e rifampicina, e ainda à estreptomicina e/ou etambutol (BRASIL, 1993). Inquéritos epidemiológicos em nível mundial têm sido realizados no sentido de se traçar um perfil de resistência do *M. tuberculosis* (BLOCH *et al.*, 1994; COHN *et al.*, 1997; EL BAGHADADI *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1997; PABLO-MENDEZ *et al.*, 1998). No Brasil, vários inquéritos foram realizados, porém de maneira esporádica e regionalizada (BARRETO & MARTINS, 1988; BEZEM *et al.*, 1988; SALEM *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 1992) sendo que o último inquérito nacional para se determinar as taxas de resistência foi realizado no ano de 1996. Os dados baseados em 80%

das amostras analisadas mostraram taxas médias de resistência primária de 3,7% e adquirida de 6,7% para isoniazida (BRAGA, 1999). Nos Estados Unidos, em 2000, um levantamento epidemiológico realizado pelo *Center of Diseases Control* em Atlanta revelou que 1% das cepas de *M. tuberculosis* isoladas dos casos de tuberculose diagnosticados eram resistentes à isoniazida e à rifampicina (AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 2002).

É importante ressaltar que, ao contrário do que se acreditava anteriormente, o *M. tuberculosis* resistente, é tão virulento e infectante quanto aquele sensível às diferentes drogas, podendo ser transmitido de um paciente bacilífero para um comunicante, resultando em um caso de infecção exógena (SNIDER, 1985).

KRITSKI *et al.* (1996), realizaram um estudo na cidade do Rio de Janeiro, avaliando a incidência e os fatores de risco associados a casos de tuberculose entre aqueles comunicantes de tuberculose multi-droga resistentes. Os autores encontraram que entre os comunicantes que adquiriram a doença, 46% deles apresentaram o mesmo perfil de resistência daqueles que provavelmente os contaminaram, demonstrando ser este um problema preocupante em saúde pública.

1.3 - Pesquisa de novas drogas para o tratamento da tuberculose

O esquema terapêutico atual utilizado para o tratamento da tuberculose apesar de ser chamado de esquema curto, tem a duração de 6 meses. Nesse sentido, a descoberta de novas drogas representa um desafio, pois, o que se espera de um novo composto é que ele possa reduzir este tempo, evitando assim o abandono do tratamento. Além disso, espera-se que as novas drogas possam ser efetivas contra as micobactérias que apresentam resistência aos tuberculostáticos e que também possam atuar sobre as micobactérias

que permanecem no organismo no estado de latência (YOUNG, 1994; TUBERCULOSIS DRUG SCREENING PROGRAM, 2001)

Na década de 80 iniciaram-se os estudos com a rifabutina, um composto derivado da rifamicina, que apresenta uma grande atividade contra as micobactérias (DICKINSON & MITCHINSON, 1987).

As fluoroquinolonas, principalmente a ciprofloxacina, teve sua atividade antibacteriana estudada em relação ao *M. tuberculosis* (SATO et al., 1990). Porém, seu uso na terapêutica demonstrou que estes bacilos desenvolveram rapidamente resistência a estes medicamentos (MUSSER, 1995).

Em relação ao estudo de novas drogas, compostos sintéticos, derivados dos quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico convencional da tuberculose, estão sendo testados quanto à sua atividade antibacteriana. YAMAMOTO et al. (1995), testando 39 compostos derivados da pirazinamida, detectaram que quatro deles apresentavam atividades bacteriostática e bactericida contra 03 espécies de micobactérias de crescimento lento, *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. tuberculosis*.

Outros compostos sintéticos como os derivados do ácido nicotínico e isonicotínico (SANTOS Jr et al.; SATO et al., 1999), derivados das propeno-aminas (De SOUZA et al., 2001a; De SOUZA et al., 2002) derivados de bifenilmetanona (De SOUZA et al., 1999; De SOUZA et al., 2001b) e derivados de nitrotiofenos (RANDO et al., 2002) têm sido testados quanto à atividade biológica contra micobactérias.

O problema da adesão aos quimioterápicos utilizados no tratamento da tuberculose e das reações colaterais provocadas por eles, tem levado os pesquisadores à busca de princípios ativos em extratos brutos de plantas e suas frações com atividade antibacteriana (COWAN, 1999). Várias espécies de plantas têm sido pesquisadas e algumas classes de compostos já foram detectadas como sendo os responsáveis pela atividade biológica contra micobactérias, como os

terpenóides (CANTRELL *et al.*, 2001) e as fisalinas (PIETRO *et al.*, 2000; JANUÁRIO *et al.*, 2002).

Entretanto, é preciso avaliar se os compostos, sejam eles naturais ou sintéticos, serão eficazes contra o *M. tuberculosis* que se encontra externa ou internamente aos macrófagos. Diferentes antibióticos eficazes contra bactérias Gram positivas ou negativas são inócuos contra o *M. tuberculosis* por ser este um patógeno intracelular facultativo.

A determinação da atividade extracelular das drogas contra o *M. tuberculosis* é realizada por diversas maneiras:

1.4 – Métodos para a determinação do perfil de sensibilidade

Para se determinar o perfil de sensibilidade do *M. tuberculosis* frente aos quimioterápicos, três métodos laboratoriais são largamente utilizados. O método das concentrações absolutas que também é referido como a determinação da concentração inibitória mínima, o método da proporção de resistência e, ainda, o método das proporções, este último considerado o método de eleição em toda a América Latina (KANTOR & LAZLO, 1998).

O método das proporções, originalmente descrito por Middlebrook e Cohn em 1958 e modificado por Canetti *et al.* em 1963 é utilizado no Brasil, incorporando-se as drogas antituberculose utilizadas no esquema terapêutico convencional em meio de Lowenstein-Jensen. Entretanto, a obtenção dos resultados só se dá após 28 dias de incubação dos meios de cultura em estufa a 37°C (BRASIL, 1994).

1.4.1 – Novas metodologias para a determinação do perfil de sensibilidade

Face à necessidade de se obter os resultados dos testes de sensibilidade o mais rapidamente possível, novas metodologias têm sido propostas. Nos Estados Unidos os métodos mais largamente utilizados são o método das proporções realizado em agar, que dá uma resposta em aproximadamente 16 dias, e o BATEC 460 TB (Becton & Dickinson), que fornece uma resposta em aproximadamente 7 a 10 dias. Este último método detecta CO₂, marcado radioativamente e liberado após o metabolismo da micobactéria em meio de cultura apropriado que contém ¹⁴C (INDERLIED & SALFINGER, 1995; AMERICAN THORACIC SOCIETY AND CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2000). O sistema MGIT - Mycobacteria Growth Indicator Tube (Becton & Dickinson), disponibilizado no mercado como uma alternativa ao sistema BACTEC 460, detecta o consumo de oxigênio das micobactérias empregando-se o rutênio como um sensor químico fluorescente. Esta metodologia tem a vantagem de não ser radioativa, podendo-se obter um perfil de resistência à drogas em cerca de 5 dias (PALACI *et al.*, 1996; WALTERS & HANNA, 1996; BERGMANN *et al.*, 2000; MACONDO *et al.*, 2000; TELLES *et al.*, 2002). Mais recentemente foi lançado no mercado internacional o sistema MB/BacT (Bio Merieux), que se baseia na detecção do consumo de oxigênio proveniente do metabolismo da micobactéria por um sensor colorimétrico, em um sistema totalmente automatizado, onde as leituras são feitas de 10 em 10 minutos, podendo-se obter os resultados de testes de sensibilidade em torno de 4 a 7 dias (BEER *et al.*, 1997; TORTOLI *et al.*, 2000; YEW *et al.*, 2001; SATO *et al.*, 2001; BARRETO *et al.*, 2002)

Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de se obter em um período de 24 a 72 horas os resultados de susceptibilidade do *M. tuberculosis* e *M. avium* a diferentes drogas. As cepas bacterianas após serem inoculadas no meio de cultura são incubadas a 37⁰C por 24 a 72 horas, quando então se adiciona a essa preparação o diacetato de fluoresceína (FDA). Este reagente facilmente atravessa a

membrana hidrofóbica das micobactérias sendo rapidamente hidrolisado a fluoresceína livre que, acumulada no interior das células vivas, provoca a luminescência que é detectada em citômetro de fluxo (NORDEN *et al.*, 1996; MOORE, 1999; VENA *et al.*, 2000).

1.4.2 – Métodos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O Etest (AB BIODISK) descrito como uma metodologia que facilmente permite determinar-se a Concentração Inibitória Mínima das drogas, baseia-se na utilização de uma tira plástica contendo um gradiente pré-definido de concentração de drogas de maneira a se obter 15 diluições seriadas. Estudos comparativos desta metodologia com o método das proporções e com o sistema BATEC460 para determinação do perfil de susceptibilidade do *M. tuberculosis* frente a diferentes drogas, mostraram excelente equivalência entre eles (WANGER & MILLS, 1996; SANCHEZ *et al.*, 1999; KAKKAR *et al.*, 2000).

O método mais comumente utilizado para determinação da Concentração Inibitória Mínima é o da macrodiluição em tubo empregando-se um meio líquido, onde se determinava a concentração mínima em $\mu\text{g/mL}$, do agente antimicrobiano capaz de inibir 99% da população bacteriana, *in vitro* (LEE & HEIFETS, 1987). Neste método, a cada tubo contendo meio de cultura são adicionados a suspensão bacilar e uma quantidade do agente antimicobacteriano diluído seriadamente. No final do ensaio, após a incubação a 37°C por tempo determinado, os meios são examinados visualmente para comprovar presença ou ausência de turvação, indicando se o crescimento bacteriano foi inibido ou não. A CIM é considerada como a concentração de antibiótico contida no primeiro tubo da série que inibe o crescimento visível das bactérias. A técnica é reprodutível mas trabalhosa, uma vez que requer muitos tubos para análise de uma

única droga (BERETTA, 1997; SATO *et al.*, 1999). A vantagem desta técnica em relação ao Etest é a possibilidade da técnica da CIM ser empregada para analisar atividade antimicobacteriana de novas drogas tanto sintéticas como de origem vegetal.

No sentido de agilizar a resposta dos testes de sensibilidade das micobactérias de crescimento lento, técnicas de microdiluição em placa têm sido propostas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima. Apesar de serem de baixo custo, estas técnicas apresentam algumas dificuldades na interpretação final dos resultados, pois para a leitura é visual (WALLACE *et al.*, 1986; TELLES & YATES, 1994; LEITE *et al.*, 2000).

1.4.3 – Técnicas de microdiluição em placa utilizando o Alamar Blue ou MTT como revelador de crescimento bacteriano.

O Alamar Blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000) e o MTT (brometo de dimetiliazol-difeniltetrazólio) são reagentes capazes de revelar uma reação de oxido-redução. O Alamar Blue foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.*, 1994) e o MTT para avaliar a citotoxicidade de compostos sintéticos ou naturais (CARMICHAEL, *et al.*, 1987; VISTICA *et al.*, 1991; De SOUZA *et al.*, 2001a; BETANCUR-GALVIS *et al.*, 2002).

O Alamar Blue tem sido empregado na determinação do perfil de sensibilidade de bactérias (NOVAK *et al.*, 1993; ZABRANSKY *et al.*, 1995; DeFORGE *et al.*, 2000; SALVAT *et al.*, 2001) e fungos (TIBALLI *et al.*, 1995; LIAO *et al.*, 2002) em relação a diferentes quimioterápicos e na detecção de atividade antiviral de novos compostos (SMEE *et al.*, 2002). Vários estudos têm sido realizados na determinação do perfil de susceptibilidade do *M. tuberculosis* e do Complexo *M. avium* – *M. intracellulare* frente a diferentes

quimioterápicos, utilizando-se o Alamar Blue como indicador do metabolismo e do crescimento bacteriano (COLLINS & FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU *et al.*, 1998; SATO *et al.*, 1998; PALOMINO & PORTAELS, 1999; SILVA, *et al.*, 1999). A partir da experiência de YAJKO *et al.* (1995), que utilizaram o Alamar Blue para a detecção do perfil de sensibilidade de micobactérias a diferentes drogas utilizando-se a diluição em tubos, COLLINS & FRANZBLAU (1997) preconizaram a técnica do Alamar Blue com microdiluição em placa (Microplate Alamar Blue Assay - MABA). A comparação entre esta técnica e o BATEC460 para determinar-se o perfil de sensibilidade do *M. tuberculosis* H37Ra e H37Rv frente a uma série de quimioterápicos demonstrou que a MABA, por ser uma técnica rápida, sensível, não radiométrica e, principalmente, por ter um custo baixo, poderia ser de grande utilidade para se determinar a Concentração Inibitória Mínima principalmente quando se trabalha com um grande número de novos compostos, frente àquelas micobactérias de crescimento lento. Estudos mais recentes apontam para o emprego da MABA na determinação da atividade antimicobacteriana de princípios ativos naturais (PIETRO *et al.*, 2000; JANUÁRIO *et al.*, 2002; LEAL *et al.*, 2003) ou sintéticos (De SOUZA *et al.*, 1999; De SOUZA *et al.*, 2001a; De SOUZA *et al.*, 2001b; STEPHENS *et al.*, 2001; RANDO *et al.*, 2002; De SOUZA *et al.*, 2002; ULUSOY, 2002). O aumento de cepas de *M. tuberculosis* multi-droga resistentes, revelou a necessidade de se detectar o mais rápido possível esta resistência. Por ser uma técnica pouco onerosa e de execução relativamente simples, seu uso poderá ser difundido para países em desenvolvimento, onde a incidência de tuberculose é alta e a possibilidade do aumento de casos de tuberculose multi-droga resistente é eminente (FRANZBLAU *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1999; PALOMINO & PORTAELS, 1999; BASTIAN *et al.*, 2001; SUNGKANUPARPH *et al.*, 2002).

A capacidade de células vivas reduzirem o MTT a sais de formazan tem sido largamente utilizada na determinação do perfil de

susceptibilidade de novas drogas com possível atividade antimicobacteriana. Por ser uma metodologia colorimétrica, de fácil manejo e de baixo custo tem sido proposta para a determinação da resistência de cepas de *M. tuberculosis* aos quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico convencional (MSHANA *et al.*, 1998; ABATE *et al.*, 1998; De LOGU *et al.*, 2001; FOONGLADDA *et al.*, 2002; CAVIEDES *et al.*, 2002) e para avaliar a atividade biológica de novos compostos sintéticos pela determinação da Concentração Inibitória Mínima destes compostos frente ao *M. avium* (GOMEZ-FLORES *et al.*, 1995).

1.4.4 – Técnicas que utilizam *M. tuberculosis* contendo o gene da luciferase

Tecnologias mais recentes têm empregado a bioluminescência para determinar-se o perfil de sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis*, dentre elas o método do “vagalume” (firefly luciferase-luciferin), pelo qual é possível realizar uma triagem rápida de diferentes quimioterápicos. A introdução do plasmídeo pLUC10 pelo processo de eletroporação permite monitorar a atividade antimicobacteriana dos compostos, pois, quando o *M. tuberculosis* contendo o gene da luciferase é colocado em contato com uma determinada droga, se ele é resistente, sobreviverá produzindo a luciferase que em contato com o substrato, a luciferina, mais o ATP da bactéria, haverá a geração de luz que é detectada pelo luminômetro. Esta reação, no entanto, é do tipo “flash”, ou seja, quando colocamos o substrato a leitura tem que ser imediata (JACOBS *et al.*, 1993; COOKSEY *et al.*, 1993). Esta técnica reduz o tempo de espera para a obtenção de resultados de sensibilidade de semanas para dias, sendo de grande importância na avaliação de novas drogas antibacterianas.

A bioluminescência pode ser produzida por vagalumes ou por bactérias vivendo em relação de simbiose com outro microrganismo (BELAS *et al.*, 1982). SNEWIN *et al.* (1999) utilizaram a cepa de *M. tuberculosis* recombinante onde o gene codificador da enzima luciferase (*lux*) é proveniente da bactéria *Vibrio harveyi*, de tal forma que um sinal luminescente é gerado em presença do substrato (solução etanólica de n-decil-aldeído 1%) e da flavina mononucleotídeo (FMNH₂) proveniente do bacilo vivo. Comparando-se os resultados de luminescência de cepas de *M. tuberculosis* contendo diferentes plasmídeos com gene *lux*, SNEWIN *et al.* (1999) concluíram ser o plasmídeo pSMT1 o que se mostrou mais estável e gerou maior quantidade de luz quando estas micobactérias infectam macrófagos de linhagem. A micobactéria recombinante foi obtida pela eletroporação do *M. tuberculosis* H37Rv com o plasmídeo pSMT1 contendo o gene *luxA* e *luxB* de *Vibrio harveyi* e gene de resistência a higromicina como marca de seleção. A luciferase bacteriana de *Vibrio harveyi* é um dímero expresso pelos genes *luxA* e *luxB* e estão sob a regulação do promotor *hsp60* do *M. tuberculosis* (SNEWIN *et al.*, 1999).

1.4.5 – Avaliação da atividade intracelular

Para que uma nova droga seja considerada ideal como um quimioterápico é importante que ela seja ativa também para as micobactérias que se encontram no interior dos macrófagos. A metodologia mais comumente utilizada para avaliar a atividade micobactericida das drogas no interior de macrófagos é a da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Nesta técnica realiza-se a contagem de colônias de micobactérias que se desenvolvem no meio sólido Middlebrook 7H10 após a lise dos macrófagos e semeadura das micobactérias que estavam presentes no seu interior. A determinação das atividades inibitória e bactericida

do composto KRM-1648, um novo composto derivado da rifamicina-rifalazil, contra *M. tuberculosis* e *M. avium* fagocitadas por macrófagos humanos, foi realizada utilizando a técnica da contagem de unidades formadoras de colônias (MOR *et al.*, 1995; MOR *et al.*, 1996).

Em vista do exposto, neste trabalho nos propomos a avaliar a utilização desta micobactéria recombinante na determinação da atividade antimicobacteriana de novos compostos sintéticos e naturais contra micobactérias extracelulares através da padronização de metodologia eficaz e reprodutível. Pretende-se verificar também a utilização desta micobactéria recombinante no estudo das drogas sintéticas e extratos naturais sobre as micobactérias internalizadas em macrófagos.

2. OBJETIVO GERAL:

Este trabalho teve como objetivo padronizar metodologias e determinar a atividade antimicobacteriana de princípios ativos naturais ou sintéticos empregando o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 e o *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o gene da luciferase proveniente do *Vibrio harveyi*.

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 - Padronização da técnica da luciferase extracelular e intracelular empregando-se a isoniazida, a rifampicina, o *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294 e o *M. tuberculosis* Erdman – ATCC 35801 contendo o gene da luciferase.

2.1.2 - Avaliação da atividade antimicobacteriana extracelular e intracelular de algumas drogas sintéticas e extratos vegetais, empregando as metodologias padronizadas, o *M. tuberculosis* H37Rv

– ATCC 27294 e o *M. tuberculosis* Erdman – ATCC 35801 contendo o gene da luciferase.

2.1.3 - Avaliação da atividade antimicobacteriana extracelular das mesmas drogas sintéticas e extratos vegetais frente ao *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294, empregando-se a técnica já padronizada da microdiluição em placas utilizando como revelador de crescimento bacteriano o Alamar Blue (MABA – Microplate Alamar Blue Assay).

2.1.4 - Avaliação da atividade antimicobacteriana intracelular das mesmas drogas sintéticas e extratos vegetais frente ao *M. tuberculosis* Erdman – ATCC 35801, empregando-se a técnica da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

2.1.5 - Comparação das quatro metodologias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – AMOSTRAS

3.1.1 – Extratos vegetais

Foram preparadas soluções estoque em dimetilsulfoxido (DMSO) dos extratos vegetais de *Rosmarinus* sp, *Eugenia* sp, *Tabernaemontana* sp, *Ocimum* sp (denominados de A1 a A5), *Physalis* sp, *Dipterix* sp, *Aristolochia* sp (denominados de 1L a 3L e 6L a 8L) e *Olostylis* sp (denominado de 5L), apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Relação dos extratos vegetais utilizados na determinação da atividade antimicobacteriana.

Planta	Parte do vegetal	Solvente utilizado	Solução Estoque (mg/mL)	Procedência
<i>Rosmarinus sp</i>	folhas	CO ₂ , etanol, isopropanol	4,4	UNICAMP
<i>Eugenia sp</i>	botão	CO ₂	21,6	UNICAMP
<i>Tabernaemontana sp</i>	folhas e galhos	CO ₂ , etanol	4,6	UNICAMP
<i>Ocimum sp</i>	folhas	CO ₂	12,8	UNICAMP
<i>Physalis sp</i>	folhas	etanol/água	300,0	UNAERP
<i>Dipterix sp</i>	folhas	etanol/água	300,0	UNAERP
<i>Aristolochia sp</i>	caule, folhas e raiz	acetona e hexano	10,0	UNESP
<i>Olostylis sp</i>	folhas	acetona	14,1	UNESP

3.1.2 - Drogas sintéticas

Foram utilizadas soluções estoque de 10,0 mg/mL em dimetilsulfoxido (DMSO - Sigma) de produtos derivados da hidrazida do ácido benzóico [(5-nitro-tiofeno-2-il)-metileno] denominados de DBL, um produto derivado da estreptomicina denominado I₉ e soluções aquosas de concentração 128 µg/mL, de produtos sintéticos da prata denominados de Ag mand e Ag tart.

3.1.3 - Droga de referência

Foram utilizadas soluções estoque de isoniazida (INH - Sigma) de concentração 10 mg/mL em água destilada e de rifampicina (RFP - Sigma) de concentração 10mg/mL em metanol como drogas de referência para a padronização das metodologias.

3.2 - Cepas de *M. tuberculosis*

3.2.1 - A cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv - ATCC 27294 (gentilmente cedida pelo Dr. Scott Franzblau do Institute for Tuberculosis Research – University of Illinois at Chicago) foi utilizada para adequação da técnica do MABA com a isoniazida e a rifampicina e determinação da CIM dos extratos vegetais e drogas sintéticas por esta técnica. A cultura bacilar foi mantida em meio de Lowenstein-Jensen até o momento do uso.

3.2.2 - A cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 recombinante (gentilmente cedida pelo Dr. Scott Franzblau do Institute for Tuberculosis Research, University of Illinois at Chicago, USA), contendo o plasmídeo pSMT1 (gentilmente cedido pelo Dr. Stefan Hoyle do Imperial College School of Science, Technology and Medicine, London, UK), foi utilizada para padronizar a técnica da luciferase extracelular, empregando-se a rifampicina e determinação da CIM dos extratos vegetais e drogas sintéticas por esta técnica. A cultura bacilar foi mantida em meio de Middlebrook 7H10 contendo 50 µg/mL de higromicina (Sigma) até o momento do uso.

3.2.3 - A cepa padrão de *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 recombinante (gentilmente cedida pelo Dr. Scott Franzblau do

Institute for Tuberculosis Research, University of Illinois at Chicago, USA), contendo o plasmídeo pSMT1 (gentilmente cedido pelo Dr. Stefan Hoyle do Imperial College School of Science, Technology and Medicine, London, UK) foi utilizada para padronizar a técnica da determinação da atividade biológica intracelular da rifampicina. Para tal, as células de macrófagos da linhagem J774 foram infectadas com a micobactéria. A cultura bacilar foi mantida em meio de Middlebrook 7H10 contendo 50 µg/mL de higromicina até o momento do uso.

3.3. Culturas de células

3.3.1 - A linhagem J774 (macrófagos de murino) foi utilizada para o cultivo celular. As células J774 foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂, em garrafas com superfície em torno de 12,5 cm², contendo 10mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino.

3.4 - METODOLOGIA

3.4.1 – Preparação das suspensões bacilares

Para a técnica do MABA, uma alçada da cultura de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 correspondente a 5,0 mg de peso seco, foi semeada em 2,0 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 e incubada por 10 dias a 37°C até obtenção de uma suspensão comparável com a escala nº 1 de McFarland. Desta suspensão foram semeados 1,0mL em 200 mL de meio Middlebrook 7H9 de maneira a se obter uma grande quantidade de massa bacilar. Após aproximadamente 10 dias de incubação a 37°C a suspensão de

micobactérias obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos e o sedimento foi lavado por 2 vezes com solução salina tamponada com fosfato (tampão PBS - pH = 7,0), acrescido de Tween 80 a 0,05% estéril. O sedimento obtido foi resuspenso em 50 mL de tampão PBS. A avaliação da população bacilar viável foi realizada pelo plaqueamento de uma alíquota da suspensão em meio de Middlebrook 7H10.

Para a técnica da luciferase extracelular e para a determinação da atividade intracelular da rifampicina, foram preparadas as suspensões bacilares do *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 e *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT1. As suspensões foram preparadas da mesma maneira que para o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, somente acrescentando-se ao meio Middlebrook 7H9 a higromicina (50 µg/mL).

3.4.2 - Determinação do perfil de sensibilidade

3.4.2.1 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela Técnica em Microplaca Utilizando Alamar Blue como revelador (MABA).

3.4.2.1a – Isoniazida e rifampicina (controle da metodologia)

A determinação da CIM em microplaca utilizando-se o Alamar Blue como revelador frente à cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv, foi realizada segundo técnica proposta por FRANZBLAU *et al.* (1998).

Em uma microplaca estéril transparente de 96 orifícios, foram depositados 200 µL de água destilada estéril nos orifícios de A a H das colunas 1 e 12, como indicado no **esquema 1**, para evitar a evaporação durante a incubação na estufa.

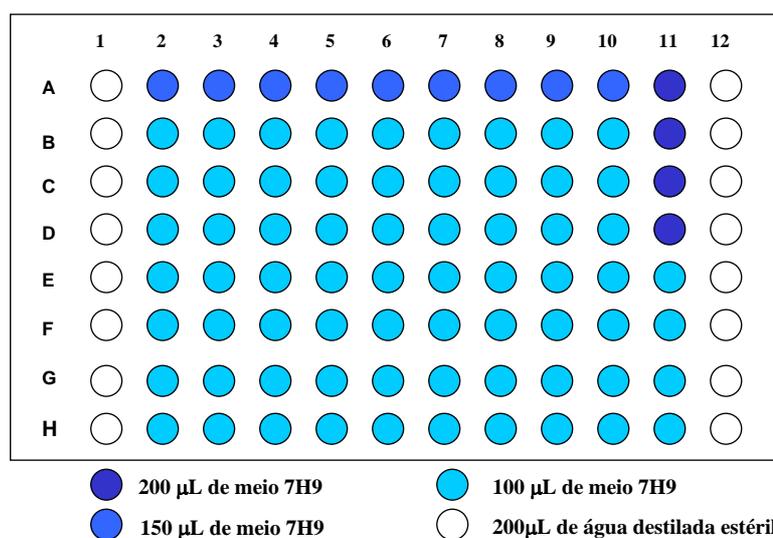
A seguir, os orifícios de A a D da coluna 11 receberam 200 μL de meio Middlebrook 7H9, os da coluna 11 de E a H 100 μL , os da linha A colunas de 2 a 10 receberam 150 μL e as demais linhas, B a H de 2 a 10 receberam 100 μL (**Esquema 1**). Os orifícios da linha A de 2 a 10 e os da linha B de 2 a 10 receberam respectivamente 50 e 100 μL das soluções-estoque da isoniazida e/ou da rifampicina preparadas no ítem **3.1.3** e diluídas a 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após a homogeneização, 100 μL das misturas contidas nos orifícios da linha B de 2 a 10 foram transferidas para a linha C de 2 a 10 e assim sucessivamente até que da linha H de 2 a 10, após homogeneização foram desprezadas 100 μL . Por último, adicionou-se em todos os orifícios, com exceção da linha A de 2 a 10 e da coluna 11 de A a D, 100 μL da suspensão de micobactérias preparada como apresentado no ítem **3.2.1** e diluída a 1:50. Dessa maneira obtivemos um volume final de 200 μL em cada orifício com as concentrações finais da isoniazida e da rifampicina de 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312 e 0,0156 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A microplaca foi selada com parafilme e incubada a 37^oC. Após 5 dias de incubação adicionou-se no orifício E-11, o volume de 25,0 μL da mistura de Tween 80 a 10,0% e Alamar Blue (TREK DIAGNOSTIC SYSTEM INC.) (V/V). A microplaca foi reincubada a 37^oC por 24 horas, após o que foi realizada a leitura visual. Ao se obter o desenvolvimento de cor rósea no orifício E-11, foram adicionados 25,0 μL da mistura de Tween 80 e Alamar Blue (V/V) nos demais orifícios, sendo as microplacas reincubadas a 37^oC por 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura final.

A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de droga capaz de inibir o crescimento de 90% da cepa de *M. tuberculosis*, ou seja, a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa. Cada droga foi

testada em duplicata e o mesmo teste foi repetido três vezes em semanas consecutivas.

ESQUEMA 1 - Configuração esquemática do preparo da placa para determinação da CIM utilizando Alamar Blue como revelador.



3.4.2.1b – Extratos vegetais e drogas sintéticas

A determinação da CIM dos extratos vegetais e das drogas sintéticas foi realizada de forma semelhante à descrita no item 3.4.2.1a, diferindo somente na concentração final dos extratos vegetais e drogas sintéticas que foram de:

- ❖ *Rosmarinus sp*, *Eugenia sp*, *Ocimum sp* (A1 a A5) e *Tabernaemontana sp* - 128; 64,0; 32,0; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0 µg/mL.
- ❖ *Physalis sp* e *Dipterix sp* – 4000; 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 µg/mL.
- ❖ *Aristolochia sp* (1L a 3L e 6L a 8L) e *Olostylis sp* (5L) - 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 µg/mL.
- ❖ Derivado de estreptomicina (I₉) – 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 µg/mL

- ❖ Ag Mand e Ag Tart - 128; 64,0; 32,0; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0 µg/mL.
- ❖ DBL - 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 µg/mL.

Ensaio em duplicatas com três repetições em semanas consecutivas também foram realizados para os extratos vegetais e as drogas sintéticas.

3.4.2.2 – Ensaio preliminar para definir parâmetros para o luminômetro SpectraFluor Plus.

Vários ensaios preliminares foram realizados para definir diferentes parâmetros como, quantidade de inóculo, tempo de leitura no luminômetro e outras medidas de calibração. Para avaliar o melhor tempo de leitura no luminômetro, foi realizada a leitura em Unidades Relativas de Luz - URL (em um intervalo de 0 a 2 horas) da suspensão bacilar de $7,8 \times 10^5$ ufc/mL. Para padronizar o tempo de incubação necessário para encontrar CIMs adequados para o ensaio da luciferase, a URL foi medida diariamente por 7 dias, utilizando-se diversas placas contendo controle de crescimento, controle de esterilidade e diluição das drogas-controle.

3.4.2.3 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica da luciferase utilizando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1.

3.4.2.3a – Isoniazida e rifampicina (controle da metodologia)

Para a determinação da CIM da isoniazida e da rifampicina pela técnica da luciferase, as microplacas foram preparadas de maneira semelhante à da técnica de MABA (item 3.4.2.1a). Entretanto, foram empregadas as microplacas estéreis brancas de 96 orifícios (PACKARD), suspensão bacilar contendo *M. tuberculosis* com

plasmídeo pSMT1 (item 3.2.2) e meio de Midlebrook 7H9 com higromicina (anexo 1).

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas por 3 dias a 37°C. Após o período de incubação foram adicionados 20 µL de *n*-decilaldeído 1,0% (Sigma) em etanol. A leitura foi realizada imediatamente com o auxílio do luminômetro (SPECTRAFluor Plus - Tecan).

A CIM foi definida como a menor concentração de droga capaz de inibir o crescimento de 90% da cepa de *M. tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1. Após a padronização, as três repetições empregadas na técnica de MABA foram também realizadas para a técnica da luciferase.

3.4.2.3b – Extratos vegetais e drogas sintéticas (padronização de metodologia)

A determinação da CIM dos extratos vegetais e das drogas sintéticas foi realizada de forma semelhante à do item 3.4.2.2a, diferindo somente na concentração final dos extratos vegetais e drogas sintéticas que foram de:

- ❖ *Rosmarinus sp*, *Eugenia sp*, *Ocimum sp* (A1 a A5) e *Tabernaemontana sp* - 128; 64,0; 32,0; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0 µg/mL.
- ❖ *Physalis sp* e *Dipterix sp* – 4000; 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 µg/mL.
- ❖ *Aristolochia sp* (1L a 3L e 6L a 8L) e *Olostylis sp* (5L) - 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 µg/mL.
- ❖ Derivado de estreptomicina (I₉) – 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06
- ❖ Ag Mand e Ag Tart - 128; 64,0; 32,0; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0 µg/mL.
- ❖ DBL - 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 µg/mL.

Os mesmos números de ensaios repetitivos foram realizados para os

extratos e as drogas sintéticas.

3.4.2.4 - Determinação do tempo de incubação das micobactérias internalizadas nos macrófagos.

Para avaliar o tempo de incubação mais adequado para manter a micobactéria recombinante internalizada no macrófago J774, sem que houvesse danos nos resultados de URL, as monocamadas infectadas contidas em microplacas foram incubadas a 37° C com 5% de CO₂ por 3, 4 e 7 dias. Nestes intervalos de tempo, foram realizadas novas lavagens do tapete com solução tamponada de Hank's (Gibco) e as células infectadas foram lisadas com 1000 µL da solução aquosa de Triton (Sigma) a 0,1%. A 180 µL desta suspensão proveniente da lise das células foram adicionados 20 µL de *n*-decil-aldeído a 1% em metanol e realizada leitura da luminescência no aparelho SPECTRAfluor Plus, sendo os resultados expressos em URL. Diluições decimais seriadas do lisado foram então semeadas em ágar 7H10, para determinação subsequente do número de unidades formadoras de colônias/mL (ufc/mL). A contagem de bactérias viáveis foi realizada para a validação das leituras em URL.

3.4.2.5 - Padronização da técnica da luciferase para determinar a atividade intracelular da rifampicina.

A padronização da determinação da atividade intracelular da rifampicina empregando-se o *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801, contendo o plasmídeo pSMT1, foi realizada segundo a técnica proposta por SNEWIN *et al.* (1999). Os resultados das leituras de URL (unidades relativas de luz), foram comparados com os obtidos pelo cultivo e determinação de UFC (unidades formadoras de colônias)

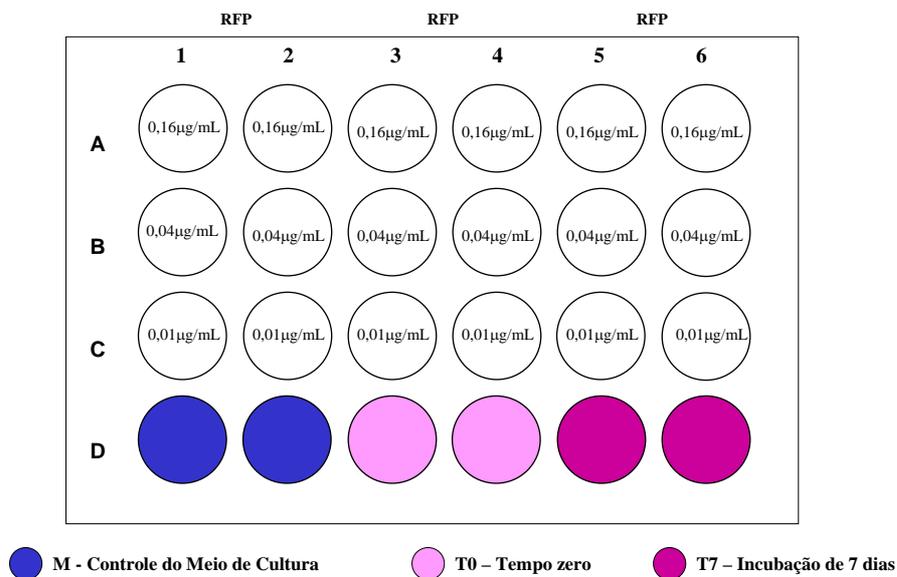
Para a preparação da monocamada do macrófago J774 e sua infecção com *M. tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1, inicialmente em

uma microplaca transparente estéril de 24 orifícios (Corning), foram depositados, em cada orifício, 1000 μL de meio de cultura RPMI. Estes foram semeados com a suspensão de células J774 e a placa incubada a 37°C com 5% de CO_2 , por 48 horas, de maneira a se obter a concentração de 5×10^5 células /mL. A seguir, o meio de cultura RPMI foi retirado e o tapete de células foi lavado com solução tamponada de Hank's. Adicionou-se então em todos os orifícios, 1000 μL da suspensão de micobactérias preparada em meio RPMI 1640, de maneira a se obter de 1 a 5 micobactérias/célula, e incubou-se a 37°C com 5% de CO_2 por 2 horas para haver a infecção dos macrófagos. Após este tempo, a suspensão de micobactérias foi retirada e o tapete de células foi lavado com solução tamponada de Hank's para eliminar as micobactérias extracelulares. O número de micobactérias que infectaram as células foi determinado pela lise de 2 orifícios contendo o tapete de células, com 1000 μL da solução aquosa de Triton 0,1%. A 180 μL desta suspensão proveniente da lise das células foram adicionados 20 μL de *n*-decil-aldeído a 1% em metanol e realizada leitura da luminescência no aparelho SPECTRAfluor Plus. Ao mesmo tempo, foi realizado o plaqueamento desta suspensão em placas contendo meio Middlebrook 7H10 dividida em 4 quadrantes, de maneira a se semear 100 μL da suspensão pura e das diluições: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . A placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 28 dias para se realizar a contagem das unidades formadoras de colônias/mL.

Em seguida, em todas as monocamadas infectadas, com exceção de duas, foram adicionados 1000 μL de cada diluição da rifampicina (nas concentrações de 0,16; 0,04; 0,01 $\mu\text{g/mL}$), em duplicata em três orifícios da microplaca, respectivamente (**esquema 2**). As microplacas foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por 3, 4 e 7 dias, quando se realizou novamente a lavagem do tapete de células com solução tamponada de Hank's, e as células infectadas submetidas à lise. Células de todos os orifícios (com ou sem as diluições da rifampicina) foram lisadas com 1000 μL da solução aquosa de Triton a 0,1%. A 180 μL desta suspensão proveniente da

lise das células foram adicionados 20 μL de *n*-decil-aldeído a 1% em metanol e realizada leitura da luminescência no aparelho SPECTRAfluor Plus para a leitura da luminescência, sendo os resultados expressos em URL. Diluições decimais seriadas do lisado foram então semeadas em ágar 7H10, para determinação subsequente do número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). A contagem de bactérias viáveis foi realizada para a validação das leituras em URL.

ESQUEMA 2 – Configuração esquemática do preparo da microplaca para a determinação da atividade inibitória intracelular.



3.4.2.6 - Definição da CIM e da porcentagem de inibição de crescimento bacteriano em macrófagos

A CIM foi definida como a menor concentração da droga presente no meio de cultura que inibiu mais de 90% da população bacteriana intracelular nos períodos de cultivos determinados. A porcentagem de inibição de crescimento bacteriano foi determinada

aplicando-se a fórmula a seguir, considerando **a** igual à média da leitura em URL dos orifícios controle-positivos (orifícios sem drogas) e **b** o resultado em URL de cada orifício com a respectiva diluição da rifampicina.

$$100 - \left(\frac{\mathbf{b} \times 100}{\mathbf{a}} \right) = \% \text{ de Inibição de Crescimento Bacteriano}$$

A CIM e a % de Inibição de Crescimento Bacteriano foram determinadas no mesmo experimento empregando-se soluções de rifampicina nas concentrações de 0,16; 0,040; 0,010 $\mu\text{g/mL}$ e tempos de incubação de 3, 4 e 7 dias.

4 - RESULTADOS

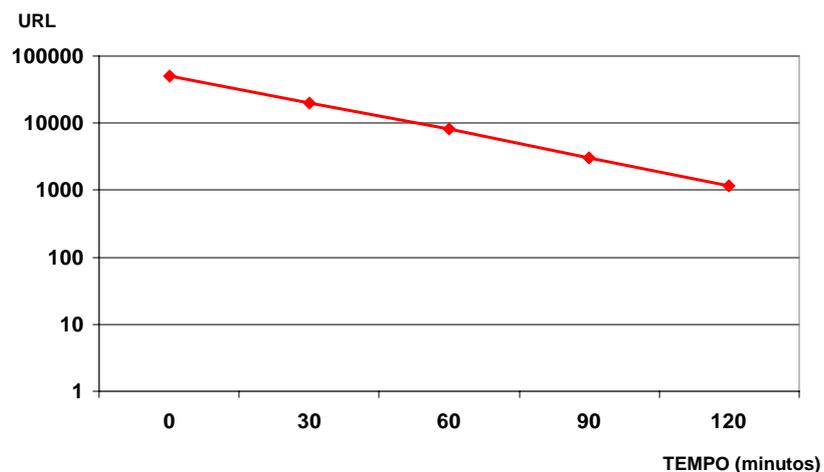
4.1 – Avaliação da população bacilar viável nas suspensões bacilares

Para a técnica do MABA foi empregada uma densidade populacional de $2,2 \times 10^5$ UFC/mL, uma vez que são necessários, pelo menos, concentração de 1×10^7 UFC/mL para se conseguir a leitura visual do crescimento bacteriano. A população bacilar viável foi determinada pelo plaqueamento de uma alíquota da suspensão do *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 em meio de Middlebrook 7H10 . Para as técnicas de luciferase intra e extracelular, foram empregados *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 e *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT1 numa densidade populacional de $7,8 \times 10^5$ UFC/mL e $2,6 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente. A população viável foi determinada pelo plaqueamento em meio de cultura Middlebrook 7H10 contendo higromicina na concentração de 50 µg/mL.

4.1.1 – Avaliação da expressão da luciferase pela determinação da URL

A expressão da luciferase foi avaliada empregando-se a micobactéria recombinante *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 numa densidade populacional correspondente a $7,8 \times 10^5$ UFC/mL. A leitura em URL da suspensão bacilar foi realizada imediatamente após a adição do substrato (n-decil-aldeído) e a cada 30 minutos até completar 2 horas de exposição da enzima com o substrato, sendo os resultados apresentados na **Figura 1**.

Figura 1 – Expressão de luciferase em *M. tuberculosis* H37Rv (controle de micobactérias) contendo o plasmídeo pSMT1



A leitura de 50646 URL foi feita imediatamente após a adição do substrato n-decil-aldeído na suspensão bacilar de concentração $7,8 \times 10^5$ UFC/mL. Foi verificada uma queda lenta menor do que uma escala logarítmica no intervalo de 1 hora.

4.2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela Técnica em Microplaca Utilizando Alamar Blue como revelador (MABA).

A leitura visual do MABA é feita pela mudança de cor do Alamar Blue, indicador de potencial de óxido-redução de azul para rosa. A cor azul foi interpretada como a concentração do composto testado que conferiu 90% de inibição do crescimento bacteriano. Os resultados de padronização com a isoniazida e a rifampicina e da determinação da CIM de 19 extratos vegetais e 13 drogas sintéticas são apresentados nas **tabelas 2 e 3**.

Tabela 2: Determinação da CIM da isoniazida, rifampicina, e produtos sintéticos, empregando o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 pela técnica do MABA.

Compostos testados	CIM (µg/mL)
Isoniazida	0,03
Rifampicina	0,015
Ag mand	8,0
Ag tart	4,0
I ₉	0,125
DBL – 3	1,0
DBL – 6	> 8,0
DBL – 13	1,0
DBL – 18	1,0
DBL – 26	0,5
DBL – 27	1,0
DBL – 28	2,0
DBL – 38	0,5
DBL – 39	0,5
DBL – 40	1,0

Tabela 3: Determinação da CIM de extratos vegetais, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 pela técnica do MABA.

Compostos testados	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Rosmarinus</i> sp – exp 1	128
<i>Tabernaemontana</i> sp– exp. 7	64
<i>Tabernaemontana</i> sp – exp. 1	128
<i>Tabernaemontana</i> sp – exp. 15	>128
<i>Eugenia</i> sp	>128
A ₁	>128
A ₂	>128
A ₃	>128
A ₄	>128
A ₅	>128
<i>Physalis</i> sp	1000
<i>Dipterix</i> sp	500
1L	1000
2L	500
3L	250
5L	500
6L	250
7L	1000
8L	500

4.3 – Padronização do tempo de incubação ideal para a realização da leitura em luminômetro.

Na **tabela 4** são apresentados os valores de CIM de acordo com o tempo de incubação (em dias). O período ótimo de incubação para o ensaio da luciferase foi considerado de 3 dias, uma vez que o valor de CIM nesse período foi coincidente com a técnica do Alamar Blue.

Tabela 4 - Comparação da CIM da isoniazida e da rifampicina pela técnica do MABA e da luciferase, em diferentes períodos de incubação empregando-se o *M. tuberculosis* recombinante, contendo o plasmídeo pSMT1.

DROGAS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	MABA	LUCIFERASE		
		3 DIAS	5 DIAS	7 DIAS
Isoniazida	0,030	0,030	0,030	0,030
Rifampicina	0,015	0,030	0,030	0,030

4.4 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima utilizando *M. tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1.

Nas **tabelas 5 e 6**, são apresentados os resultados de padronização da técnica de luciferase empregando-se o *M. tuberculosis* recombinante, contendo o plasmídeo pSMT1 e os resultados de CIM dos mesmos 19 extratos vegetais e 13 drogas sintéticas.

Tabela 5: Determinação da CIM da isoniazida, rifampicina e drogas sintéticas pela técnica da luciferase, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 recombinante, contendo o plasmídeo pSMT1.

Compostos testados	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Isoniazida	0,03
Rifampicina	0,03
Ag mand	4,0
Ag tart	4,0
DBL - 3	2,0
DBL - 6	> 8,0
DBL - 13	1,0
DBL - 18	2,0
DBL - 26	1,0
DBL - 27	2,0
DBL - 28	4,0
DBL - 38	1,0
DBL -39	1,0
DBL - 40	2,0

Tabela 6: Determinação da CIM de extratos vegetais pela técnica da luciferase, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 recombinante, contendo o plasmídeo pSMT1.

Compostos testados	CIM (µg/mL)
<i>Rosmarinus</i> sp - exp 1	128
<i>Tabernaemontana</i> sp – exp. 7	64
<i>Tabernaemontana</i> sp – exp. 1	128
<i>Tabernaemontana</i> sp – exp. 15	128
<i>Eugenia</i> sp	>128
A ₁	128
A ₂	128
A ₃	>128
A ₄	>128
A ₅	>128
<i>Physalis</i> sp	1000
<i>Dipterix</i> sp	125
1L	500
2L	500
3L	500
5L	250
6L	250
7L	500
8L	500

4.5- Comparação entre a técnica do MABA com a da luciferase

Nas **tabelas 7 e 8**, são apresentados os resultados comparativos das CIMs obtidas pela técnica do MABA e da luciferase para os extratos vegetais e as drogas sintéticas.

Tabela 7: Comparação da CIM da isoniazida, rifampicina e drogas sintéticas obtidas pela técnica do MABA e técnica da luciferase, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 contendo o plasmídeo pSMT1.

Compostos testados	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	MABA	LUCIFERASE
Isoniazida	0,03	0,03
Rifampicina	0,015	0,03
Ag mand	8,0	4,0
Ag tart	4,0	4,0
DBL - 3	1,0	2,0
DBL - 6	> 8,0	> 8,0
DBL - 13	1,0	1,0
DBL - 18	1,0	2,0
DBL - 26	0,5	1,0
DBL - 27	1,0	2,0
DBL - 28	2,0	4,0
DBL - 38	0,5	1,0
DBL - 39	0,5	1,0
DBL - 40	1,0	2,0

Tabela 8: Comparação da CIM de extratos vegetais obtidos pela técnica do MABA e técnica da luciferase, empregando-se o *M tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 recombinante, contendo o plasmídeo pSMT1.

Compostos testados	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	MABA	LUCIFERASE
<i>Rosmarinus</i> sp – exp 1	128	128
<i>Tabernaemontana</i> sp – exp. 7	64	64
<i>Tabernaemontana</i> sp – exp. 1	128	128
<i>Tabernaemontana</i> sp – exp. 15	>128	128
<i>Eugenia</i> sp	>128	>128
<i>Physalis</i> sp	1000	1000
<i>Dipterix</i> sp	500	125
A ₁	>128	128
A ₂	>128	128
A ₃	>128	>128
A ₄	>128	>128
A ₅	>128	>128
1L	1000	500
2L	500	500
3L	250	500
5L	500	250
6L	250	250
7L	1000	500
8L	500	500

4.6 – Padronização da luciferase intracelular e determinação da atividade intracelular da rifampicina, utilizando macrófagos infectados.

Na **tabela 9** são apresentados os valores de URL e de UFC/mL obtidos após a exposição do *M. tuberculosis* Erdman contendo o plasmídeo pSM1, internalizados nas células de macrófago J774, por diferentes períodos de incubação.

Tabela 9 – Unidades relativas de luz (URL) e Unidades formadoras de colônias (UFC)/mL obtidas após diferentes tempos de incubação das micobactérias com os macrófagos.

Tempos de exposição	URL	UFC/mL
Tempo zero – T0	1948	$0,8 \times 10^6$
3 dias de incubação – T3	2784	$0,2 \times 10^7$
4 dias de incubação – T4	1191	$0,5 \times 10^6$
7 dias de incubação – T7	1227	$0,4 \times 10^6$

Os resultados da atividade de diferentes concentrações da rifampicina sobre *M. tuberculosis* recombinante internalizado nas células de macrófago J774, obtidas após diferentes tempos de exposição das micobactérias são apresentados na **tabela 10 e nas figuras 2 e 3**. Cada resultado expressa a média de três repetições em duplicatas.

Tabela 10 – Resultados de URL e UFC/mL obtidos após diferentes tempos de exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações de rifampicina.

Concen tração ($\mu\text{g/mL}$)	Tempo de Incubação								
	3 dias			4 dias			7 dias		
	%			%			%		
	URL	Inibição	UFC/mL	URL	Inibição	UFC/mL	URL	Inibição	UFC/mL
RFP									
0,01	2315	17,0	$0,5 \times 10^6$	2117	0,0	$0,1 \times 10^7$	1557	0,0	$0,7 \times 10^6$
RFP									
0,04	1367	51,0	$0,1 \times 10^6$	782	34,3	$0,1 \times 10^6$	838	32,0	$0,4 \times 10^5$
RFP									
0,16	843	70,0	$0,6 \times 10^5$	252	78,8	$0,6 \times 10^5$	193	84,2	$0,1 \times 10^4$

Controle de micobactérias: 3 dias de incubação = 2789 URL e $0,2 \times 10^7$ UFC/mL
 4 dias de incubação = 1191 URL e $0,5 \times 10^6$ UFC/mL
 7 dias de incubação = 1227 URL e $0,4 \times 10^6$ UFC/mL

Figura 2 – Unidades relativas de Luz (URL) obtidas após diferentes tempos de exposição dos macrófagos a diferentes concentrações de rifampicina.

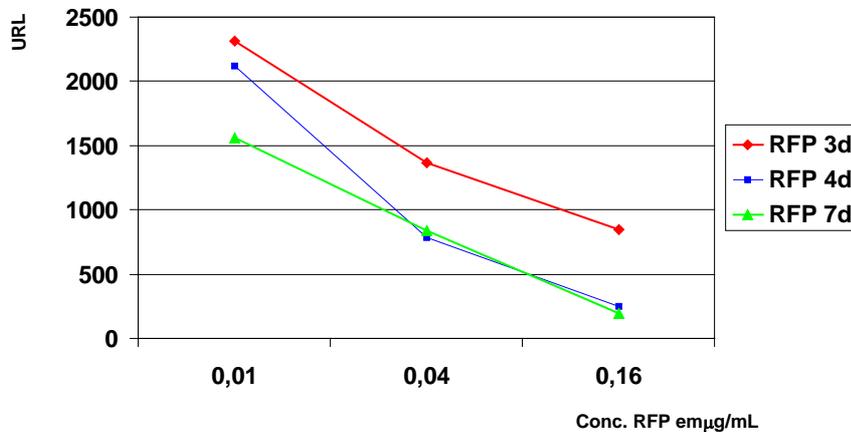
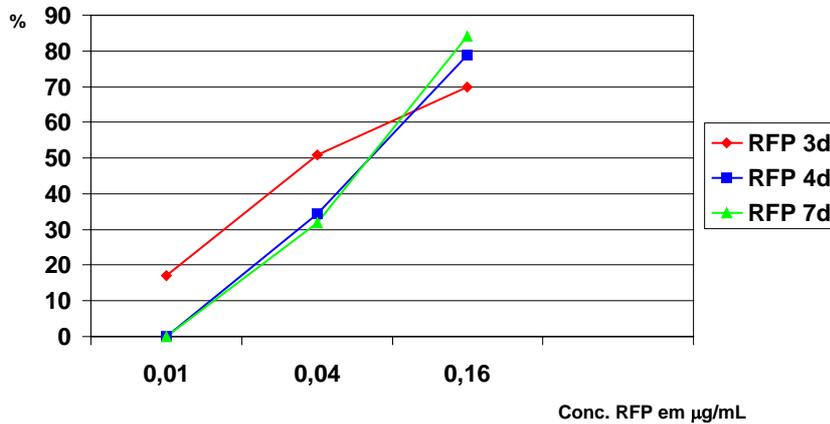


Figura 3 – Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano obtidas após diferentes tempos de exposição dos macrófagos a diferentes concentrações de rifampicina.



4.7 – Determinação da atividade intracelular de compostos sintéticos e naturais, utilizando-se macrófagos infectados com *M. tuberculosis* recombinante.

Os resultados da atividade do produto sintético da prata (Ag tart), do produto derivado da estreptomicina (I₉) e dos extratos de *Physalis* sp e de *Dipterix* sp sobre *M. tuberculosis* Erdman contendo o plasmídeo pSMT1 internalizado nas células de macrófagos J774, obtidas após 4 dias de exposição das micobactérias internalizadas nos macrófagos às diferentes concentrações dos compostos testados são apresentados nas **tabelas 11, 12 e 13**. Cada resultado expressa a média de três repetições em duplicatas.

Tabela 11 - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações do produto sintético da prata denominado de Ag tart.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	RESULTADOS		
	URL	% Inibição	UFC/mL
Controle	1674	-	$0,1 \times 10^7$
Ag tart 1,0	1356	18,9	$0,2 \times 10^7$
Ag tart 4,0	743	55,6	$0,2 \times 10^6$
Ag tart 16,0	264	84,2	$0,6 \times 10^5$

Tabela 12 - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações do produto sintético da estreptomicina denominado de I₉.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	RESULTADOS		
	URL	% Inibição	CFU/mL
Controle	2789	-	$0,2 \times 10^7$
I₉ 0,030	2837	0,0	$0,1 \times 10^7$
I₉ 0,125	2497	10,5	$0,1 \times 10^7$
I₉ 0,500	2160	22,5	$0,9 \times 10^6$

Tabela 13 - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações dos extratos de *Physalis* sp e de *Dipterix* sp.

RESULTADOS			
Concentração (µg/mL)	URL	% Inibição	CFU/mL
Controle	1014	-	$0,4 \times 10^6$
Phys 125	1848	0,0	$0,3 \times 10^7$
Phys 500	1900	0,0	$0,3 \times 10^7$
Phys 2000	281	72,2	$0,1 \times 10^4$
DipD 31,25	1648	0,0	$0,7 \times 10^6$
DipD 125	1605	0,0	$0,9 \times 10^6$
DipD 500	595	41,3	$0,7 \times 10^5$

5. DISCUSSÃO

Considerando-se a problemática da resistência do *M. tuberculosis* aos diferentes quimioterápicos (COHN *et al.*, 1997), várias têm sido as tentativas no sentido de encontrar alternativas para o tratamento da tuberculose pulmonar.

A determinação da atividade *in vitro* de novos quimioterápicos em conjunto com o conhecimento da farmacocinética da droga propiciam o desenvolvimento de esquemas terapêuticos alternativos a serem avaliados em ensaios clínicos clássicos (BURMAN, 1997).

O valor da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) *in vitro*, quando os compostos a serem testados são incorporados em meios sólidos, sejam à base de ovo, como o Lowenstein-Jensen e Ogawa ou à base de agar como o Middlebrook 7H10 (Difico) já foi muito discutido. Estes testes, além de serem métodos mais demorados e trabalhosos, também podem comprometer a estabilidade dos compostos testados, principalmente em virtude do longo período de incubação (SIDDIQI *et al.*, 1993; HEIFETS, 1988).

O meio de cultura na forma líquida tem sido com frequência utilizado na determinação da CIM de novos quimioterápicos frente ao *M. tuberculosis*, quer seja para o método convencional, macrodiluição em tubos, como para o radiométrico (BACTEC - 460). O meio líquido facilita uma maior interação entre a droga e a população bacteriana o que agiliza a interpretação dos resultados. No meio sólido a bactéria se desenvolve somente na superfície. Este fato aliado à variação do gradiente de concentração quando a droga é incorporada neste meio, pode interferir na interpretação correta dos resultados (SIDDIQI *et al.*, 1993).

O método do BACTEC tem sido muito utilizado na detecção de atividade antibacteriana de novos compostos, pois propicia resultados mais rápidos e precisos do que a macrodiluição em tubos, porém, para interpretação de seus resultados necessita de um leitor semi-automatizado. Tem como inconveniente o fato de ser um método radiométrico, pela incorporação do ^{14}C no ácido palmítico, que é detectado no CO_2 eliminado pela bactéria. Este método, na realidade, produz bons resultados. No entanto, é trabalhoso por ser semi-automatizado e caro por necessitar de meios de cultura específicos.

A metodologia da MABA apresenta como vantagens a facilidade de manipulação das diluições e da leitura, a qual pode ser feita em fluorímetro ou até mesmo visualmente, o que colabora para o seu baixo custo.

A utilização da MABA foi sugerida por FRANZBLAU *et al.* (1998) para a determinação de perfil de susceptibilidade do *M. tuberculosis* frente aos quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico tradicional, tais como, a isoniazida, a rifampicina, a pirazinamida, a estreptomicina e o etambutol. Por ser uma metodologia rápida e pouco onerosa, torna a determinação da resistência primária e/ou adquirida do *M. tuberculosis* mais acessível, principalmente para os países em desenvolvimento, onde o aumento de casos de tuberculose pulmonar multidroga resistentes têm aumentado significativamente (COHN *et al.*, 1997).

A metodologia da MABA têm sido largamente utilizada na triagem de compostos com suposta atividade antimicobacteriana sejam eles naturais (PIETRO *et al.*, 2000; JANUÁRIO *et al.*, 2002; LEAL *et al.*, 2003) ou sintéticos (De SOUZA *et al.*, 1999; De SOUZA *et al.*, 2001a; De SOUZA *et al.*, 2001b; STEPHENS *et al.*, 2001; RANDO *et al.*, 2002; De SOUZA *et al.*, 2002; ULUSOY, 2002). Em nosso trabalho, a técnica da MABA com leitura visual da CIM foi utilizada como padrão ouro na avaliação da técnica da luciferase para a determinação da atividade antimicobacteriana extracelular dos compostos testados.

Atualmente uma das preocupações dos pesquisadores é conseguir resultados da atividade antimicobacteriana de novas drogas de forma rápida, porém, com segurança para o técnico. Para tal, os experimentos são desenvolvidos utilizando-se cepas de micobactérias saprófitas, de crescimento rápido, porém, os resultados obtidos com estas cepas de micobactérias não podem ser extrapolados para os de uma cepa virulenta de *M. tuberculosis*, pois o mecanismo de resistência é distinto entre elas. ANDREW & ROBERTS (1993) utilizando uma cepa de *M. smegmatis* contendo o gene *luxA* e *luxB* isolados do *Vibrio harveyi*, avaliaram o uso da micobactéria recombinante para determinação da atividade antimicobacteriana de novos compostos. A partir dos resultados de URL obtidos comparados aos de UFC os autores concluíram que a bioluminescência da cepa recombinante demonstra a real viabilidade da cultura, mas foram cuidadosos em concluir que os dados obtidos não poderiam ser extrapolados para todas as espécies de micobactérias.

Ainda em 1993, JACOBS (1993) e COOKSEY *et al.* (1993) utilizando a cepa de *M. tuberculosis* contendo o gene da luciferase proveniente do vagalume demonstraram a possibilidade de se determinar rapidamente o perfil de sensibilidade dos quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico convencional. Entretanto, o sistema bioluminescente produzido nesta reação gera uma quantidade de luz

que quando emitida deve ser lida imediatamente (tipo “flash”). Isto significa que o substrato deve ser adicionado no momento da leitura, diretamente no luminômetro, provocando a formação de aerossóis. Dessa maneira, este procedimento fica restrito a laboratórios que possuam sistema de segurança máxima, ou seja, a utilização de laboratório P3.

BELAS *et al.* (1982) iniciaram os estudos do isolamento e expressão do gene da luciferase proveniente do *Vibrio harveyi* e verificaram uma fraca emissão de luz, quando comparadas à luminescência produzida pela bactéria isolamente e da *Escherichia coli* contendo os plasmídeos clonados com o gene *lux*. A utilização da cepa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv contendo o gene da luciferase proveniente do *Vibrio harveyi* foi preconizada por SEWIN *et al.* (1999) que demonstraram ser possível obter um sinal luminescente mais prolongado com a utilização do gene da luciferase inserido no plasmídeo pSMT1. A estabilidade da luminescência permite que o substrato seja adicionado dentro da cabine de fluxo laminar e posteriormente realizada a leitura no luminômetro sem nenhum risco para o operador. Os resultados apresentados na **figura 1** confirmam a estabilidade do sinal luminescente verificado por SNEWIN *et al.* (1999), uma vez que após 1 hora de aplicação do substrato, verificou-se queda de URL menor do que uma escala logarítmica. Para SNEWIN *et al.* (1999) e SHAWAR *et al.* (1997) existe uma correlação linear entre a viabilidade micobacteriana (medida em UFC) e a bioluminescência do *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo SNEWIN *et al.* (1999) a enzima luciferase proveniente do *Vibrio harveyi* gera luminescência correspondente a aproximadamente 10 URL para cada UFC. Entretanto, os resultados verificados neste trabalho foram de 10 a 100 UFC para cada URL indicando menor sensibilidade na capacidade de detecção do sinal luminescente de cerca de 100 vezes, sendo próximo do gene *lux* de vagalume (SNEWIN *et al.*, 1999).

Provavelmente, a diferença esteja no aparelho utilizado para a leitura da luminescência.

A partir destas informações utilizamos esta cepa recombinante para a padronização da técnica bioluminescente para determinar a CIM de compostos sintéticos e produtos naturais.

Na primeira parte do estudo foi padronizado o ensaio da luciferase determinando o volume do inóculo e tempo de leitura no aparelho. O tempo de incubação e o critério de interpretação para a redução de URL observados nas drogas padrões isoniazida e rifampicina foram utilizadas para validar o ensaio (**tabela 4**). Os testes foram conduzidos em microplacas com 96 poços. Poços de controle negativo e positivo, juntamente com os poços testes foram amostrados imediatamente após a inoculação (T_0) e após 3, 5 e 7 dias de incubação. A medida de luminescência foi realizada com o auxílio de um luminômetro próprio para a leitura de microplacas (SprectraFluor Plus – TECAN). A luminescência foi expressa como unidade relativa de luz (URL) e a alteração relativa em luminescência entre T_0 e T_3 , T_5 ou T_7 , foi calculada como uma porcentagem de inibição de crescimento. A habilidade da substância em inibir o crescimento da cepa recombinante foi indicada pela diminuição da luminescência. Os agentes antimicrobianos isoniazida e rifampicina foram incluídos no controle dos ensaios de produtos sintéticos e de extratos vegetais. Comparativamente, a microtécnica empregando-se o Alamar Blue como revelador foi utilizada para avaliar a atividade extracelular dos produtos sintéticos e extratos vegetais.

Nossos resultados de CIM pela técnica de MABA e luciferase extracelular foram de 0,030 $\mu\text{g/mL}$ para a rifampicina e para a isoniazida. Estes resultados indicam uma perfeita coerência entre a técnica da luciferase e do Alamar Blue, valores estes que encontram respaldo na literatura. Nos métodos tradicionais a CIM da rifampicina para *M. tuberculosis* H37Rv é de 0,16 $\mu\text{g/mL}$, num intervalo de valores que variam de 0,025 a 0,2 $\mu\text{g/mL}$ e a da isoniazida de 0,044 $\mu\text{g/mL}$,

num intervalo de valores que variam de 0,025 a 0,050 $\mu\text{g/mL}$ (COLLINS & FRANZBLAU, 1997).

Ao se comparar as duas metodologias para determinação da CIM dos extratos vegetais e drogas sintéticas (**tabelas 7 e 8**), foi verificada uma concordância dos resultados, com diferenças de apenas uma diluição, o que pode ser atribuído a problemas técnicos, como diferença nas ponteiras, modo de pipetagem, etc.

A metodologia da luciferase para a determinação da CIM de novos compostos com ação antimicobacteriana tem uma vantagem em relação à técnica do MABA no que diz respeito ao tempo para a obtenção da leitura final, que é de 7 dias, nesta última técnica, contra 3 dias na técnica da luciferase. Além do mais, oferece outra vantagem que é não sofrer interferência da cor do composto a ser testado, principalmente no caso de extratos vegetais que normalmente apresentam uma cor verde escura ou marrom escura o que pode interferir na leitura visual do MABA.

O passo seguinte na triagem de novas drogas é determinar se um novo composto pode inibir o crescimento do *M. tuberculosis* que se encontra no interior de macrófagos (TUBERCULOSIS DRUG SCREENING PROGRAM, 2001).

Para avaliação da atividade antimicobacteriana intracelular de novas drogas vários modelos experimentais de macrófagos têm sido descritos, como a utilização dos macrófagos humanos, mas o mais comumente utilizado é a linhagem celular de macrófago de murino J774 (WRIGHT *et al.*, 1996).

A metodologia convencional consiste em se determinar a porcentagem de inibição do composto a ser testado pela contagem de UFC/mL após a lise dos macrófagos previamente infectados pelo *M. tuberculosis* e exposto a diferentes gradientes de concentrações de drogas por 7 dias. Após a lise, realiza-se o plaqueamento das diluições do lisado (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em meio de cultura sólido Middlebrook 7H10. A leitura deste plaqueamento é realizada após 28 dias de incubação a 37°C . Isto faz com que esta metodologia seja trabalhosa, morosa e de alto custo.

No intuito de simplificar a determinação da atividade intracelular de novos compostos, diferentes autores têm sugerido a medida da luminescência como um marcador de viabilidade bacteriana (ARAIN *et al.*, 1996; DEB *et al.*, 2000). Nossos resultados apresentados na **tabela 9** demonstraram uma estabilidade na expressão da URL durante todo os 7 dias de incubação havendo uma correlação constante entre UFC/URL. ARAIN *et al.* utilizando *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* contendo o gene da luciferase também verificaram correspondência linear entre os resultados de URL com os de UFC. Além disso, a utilização da luminescência como uma medida da viabilidade da micobactéria foi confirmada durante a infecção em culturas celulares de macrófagos (SNEWIN *et al.*, 1999).

Na padronização da técnica de luciferase intracelular, nossos resultados (**tabela 10**) indicaram ocorrência de ação micobactericida da rifampicina na concentração de 0,16 µg/mL, sendo comparáveis os resultados determinados tanto pela técnica da luciferase (URL e porcentagem de inibição) como pelo plaqueamento (UFC/mL). Estes resultados concordam com os de MOR *et al.* (1995) que verificaram atividade intracelular da rifampicina no intervalo entre 0,12 a 0,25 µg/mL, utilizando-se a técnica de plaqueamento para determinar UFC/mL de *M. tuberculosis* infectado em macrófagos.

A similaridade dos resultados obtidos entre as técnicas da luciferase e plaqueamento para determinar a atividade intracelular da rifampicina e sua correspondência com os dados da literatura indicam que a metodologia por nós proposta está padronizada.

Assim, empregando-se o *M. tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1 e a metodologia padronizada, a etapa seguinte foi determinar a atividade intracelular de extratos de plantas (*Dipterix* sp e *Physalis* sp) e drogas sintéticas (Ag tart e I₉) que apresentaram boa atividade extracelular. Os resultados dos ensaios apresentados nas **tabelas 11, 12 e 13**, demonstram que a atividade intracelular do Ag tart foi verificada na concentração de 16,0 µg/mL detectado tanto pela técnica de luciferase com porcentagem de inibição de 84,2% como

pelo plaqueamento com redução de 2 log na viabilidade da micobactéria. O produto derivado da estreptomicina (I₉) não apresentou atividade intracelular nas duas metodologias (luciferase e plaqueamento), mesmo na maior concentração (0,50 µg/mL).

Entre os extratos de plantas, a *Physalis* sp foi ativa intracelularmente na concentração de 2000 µg/mL apresentando na técnica da luciferase uma porcentagem de inibição de 72,2% e redução de 2 log no plaqueamento. A *Dipterix* sp não foi ativa mesmo na concentração mais alta (500 µg/mL) nas duas metodologias.

A técnica da luciferase utilizada para a determinação da atividade intracelular dos compostos, permite a obtenção dos resultados de porcentagem de inibição em apenas 3, 4 ou 7 dias de incubação contra os 28 dias necessários para a determinação da contagem de UFC/mL. Além da rapidez dos resultados a técnica da luciferase, evita todo trabalho de plaqueamento e o custo elevado dos insumos utilizados para a determinação da UFC. Entretanto, a metodologia não pode ser utilizada em qualquer cepa de micobactéria isolada, mas somente em cepas recombinantes (HATFULL & JACOBS, 1994).

Podemos concluir que, a partir do meio de cultura Middlebrook 7H9, na determinação da CIM, ou, a partir do sistema de cultura celular, na determinação da porcentagem de inibição de compostos testados intracelularmente, a utilização da técnica da luciferase poderá ser uma ferramenta rápida não somente para determinarmos o número de micobactérias viáveis mas também para determinar o “status” metabólico da população micobacteriana.

O trabalho por nós padronizado empregando o *M. tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1 é, portanto, viável e reprodutível, permitindo determinar a atividade antimicobacteriana intra e extracelular. Pela rapidez na obtenção dos resultados e facilidade nos manuseios, esta técnica será útil na triagem de grandes quantidades de compostos sintéticos e/ou extratos vegetais.

6 – CONCLUSÕES

- ❖ A estabilidade do sinal luminescente da cepa de *M. tuberculosis* recombinante contendo o gene da luciferase foi confirmada em nosso estudo, uma vez que após 1 hora de aplicação do substrato, foi verificada queda de URL menor do que 1 na escala logarítmica.
- ❖ A técnica da microdiluição em placa empregando-se o *M. tuberculosis* contendo o gene da luciferase determina a CIM dos compostos sintéticos e naturais em 3 dias, contra 7 dias da técnica do MABA.
- ❖ Uma constante correlação entre UFC e URL foi verificada durante os diferentes períodos de incubação da micobactéria recombinante internalizada no interior dos macrófagos.

- ❖ A determinação da porcentagem de inibição de crescimento das micobactérias internalizadas em macrófagos pela técnica da luciferase, é realizada em 4 dias contra os 28 dias da contagem de UFC.
- ❖ A utilização da técnica bioluminescente propiciará a realização de triagens rápidas e sensíveis de compostos sintéticos ou naturais na determinação da atividade antimicobacteriana intra e extracelular.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, G.; MSHANA, R. N.; MEORNER, H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Tuber. Lung Dis.**, v. 2, n. 12, p. 1011-1016, 1998.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. ; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AMERICAN LUNG ASSOCIATION. Multidrug-resistant tuberculosis. Disponível em 06 dez. 2003.
<<http://www.lungusa.org/diseases/mdrtbfac.html>>.

AMERICAN THORACIC SOCIETY AND CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **Am. Rev. Resp. Dis.** , v. 161, p. 1376-1396, 2000.

ANDREW, P. W; ROBERTS, I. S. Construction of a bioluminescent mycobacterium and its use for assay of antimycobacterial agents. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 9, p. 2251-2254, 1993.

ARAIN, T. M.; RESCONI, A. E.; SINGH, D. C.; STOVER, C. K. Reporter gene technology to assess activity of antimycobacterial agents in macrophages. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 40, n. 6, p. 1542-1544, 1996.

BARRETO, A. M. W.; MARTINS, F. M. Estudo da resistência primária no Brasil no período de 1986 a 1988. **Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.**, v. 2, p. 21-25, 1988.

BARRETO, A. M. W.; ARAÚJO, J. B. M.; MEDEIROS, R. F. M.; CALDAS, P.C.S. Direct sensitivity test of the MB/BacT system. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 263-264, 2002.

BASTIAN, I.; RIGOUTS, L.; PALOMINO, J. C.; PORTAELS, F. Kanamycin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using Mycobacteria Growth Indicator Tube and a colorimetric method. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 6, p. 1934-6, 2001.

BEER, J.; KUCHLER, R.; RODLOFF, A. C. investigations about the possibility for testing the susceptibility of mycobacteria with the MB/BacT culture system. **L. Med.** v. 21, n. 7-8, p. 390-398, 1997.

BELAS, R.; MILEHAN, A.; COHN, D.; HILMAN, M.; SIMON, M.; SILVERMAN, M. Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*. **Science**, v. 218, n. 4574, p. 791-793, 1982.

BERETTA, A. L. R. Z. **Estudo comparativo de dois métodos para determinar a sensibilidade de *Mycobacterium tuberculosis* frente aos quimioterápicos**. 1997 Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências , Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”. Rio Claro, 1997.

BERGAMANN, J. S.; FISH, G.; WOODS, G. L. Evaluation of the BBL MGIT (Mycobacteria growth indicator tube) AST SIRE system for antimycobacterial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to 4 primary antituberculous drugs. **Arch. Pathol. Lab. Méd.**, v. 124, n. 1, p. 82-86, 2000.

BETANCUR-GALVIS, L. A.; MORALES, G. E.; FORERO, J. E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 541-546, 2002.

BEZEM, L. S.; VIEIRA, L. M. T.; ABRAHÃO, J. S.; GOMES, C.; ANDRADE, A. J. S. Resistência primária aos tuberculostáticos no Estado de Santa Catarina. **Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.**, v. 2, p. 34-44, 1988.

BLOCH, A. B.; CAUTHEN, G. M.; ONORATO, I. M.; DANSBURY, K. G.; KELLY, G. D.; DRIVER, C. R.; SNIDER Jr, D. E. Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. **JAMA**, v. 271, n. 9, p. 665-6671, 1994.

BRAGA, J. U.; BARRETO, A. M. W.; HIIJAR, M. A. Nationwide survey of drug resistance in Brazil. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.** v. 3, suppl I, p. S-121, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. PNCT/Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Uma proposta de classificação e condutas para casos de tuberculose no Brasil:** recomendações da Reunião Técnica realizada em junho/1992, com o objetivo de rever conceitos de casos de tuberculose e recomendações para quimioterapia. **J. Pneumol.**, v. 19, n. 1, p. 1-3,1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose.** 2. ed., Rio de Janeiro, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Atualização das recomendações para tratamento da co-Infecção HIV/Tuberculose em adultos e adolescentes.** Brasília: MS/|Coordenação-Geral de Documentação e Informação/SAA/SE, 2001, 9 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose.** Brasília, 2002, 64 p. (Cadernos de Atenção Básica nº 6. série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 148).

BURMAN, W. J. The value of in vitro drug activity and pharmacokinetics in predicting the effectiveness of antimycobacterial therapy: a critical review. **Am. J. Med. Sci.**, v. 313, n. 6. p. 355-363, 1997.

CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med.**, v. 67, p. 1-10, 2001.

CANTWELL, M. F.; SNIDER Jr, D. E.; CAUTHEN, G. M.; ONORATO, I. M. Epidemiology of Tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. **JAMA**, v. 272, n.7, p, 535-539, 1994.

CARMICHAEL, J.; DeGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. S.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res.**, v.47, p. 936-942, 1987.

CAVIEDES, L.; DELGADO, J.; CILMAN, R. H. Tetrazolium Microplate Assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1873-1874, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons- Florida and New York, 1988-1991. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, v. 40, n. 34, p. 585-591, 1991.

COHN, D. L.; BUSTREO, F.; RAVIGLIONE, M. C. Drug-resistant tuberculosis: review of de worldwide situation and the WHO/ IUATLD Global Surveillance Project. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, suppl. 1, p. S121-130, 1997.

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents Chemother** , v. 41, n. 5, p. 1004-1009, 1997.

COOKSEY, R. C.; CRAWFORD, J. T.; JACOBS, W. R.; SHINNICK, T. M. A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly

luciferase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, n. 6, p. 1348-1352, 1993.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DEB, D K.; SRIVASTAVA, K. K.; SRIVASTAVA, R.; SRIVASTAVA, B. S. Bioluminescent *Mycobacterium aurum* expressing firefly luciferase for rapid and high throughput screening of antimycobacterial drugs *in vitro* and in infected macrophages. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 279, n. 2, 457-461, 2000.

DeFORGE, L. E.; BILLECI, K. L.; KRAMER, S. M. Effect of IFN-gamma on the killing of *S. aureus* in human whole blood. Assessment of bacterial viability by CFU determination and by a new method using Alamar Blue. **J. Immunol. Methods**, v. 245, n. 1-2, p. 79-89, 2000.

De LOGU, A.; UDA, P.; PELLERANO, M. L.; PUSCEDDU, M. C.; SADDI, B.; SCHIVO, M. I. Comparison of two colorimetric methods for determining resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin, isoniazid and streptomycin in liquid medium. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, n. 1, p. 33-39, 2001.

De SOUZA, A. O.; ALDERETE, J. B.; SCHIMIDT, F.; SATO, D. N.; DURAN, N. Structure-activity relationship analysis of 4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-X-phenylmethanone derivatives and activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Arzneimittelforschung**, v. 49, n. 12, p. 1025-1029, 1999.

De SOUZA, A. O.; SANTOS Jr, R. R.; FERREIRA-JULIO, J. F.; RODRIGUEZ, J. A.; MELHO, P. S.; HAUN, M.; SATO, D. N.; DURAN, N. Synthesis, antimycobacterial activities and cytotoxicity on V79 of 3-

[4'-Y-(1,1'-biphenyl)-4-yl]-N,N,dimethyl-3-(4-X-phenyl)-propen-1-amine derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, n. 10, p. 843-850, 2001a.

De SOUZA, A. O.; SANTOS Jr, R. R.; MELO, P. S.; ALDERETE, J. B.; De CONTI, R.; HAUN, M.; SATO, D. N.; DURAN, N. Antimycobacterial activity of 4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-X-phenylmethanone derivatives, and their acute toxicity and cytotoxicity. **Pharmazie**, v. 56, n. 11, p. 871-874, 2001b.

De SOUZA, A. O.; HEMERLY, F. P.; BUSOLLO, A. C.; MELO, P. S.; MACHADO, G. M.; MIRANDA, C. C.; SANTA-RITA, R. M.; HAUN, M.; LEON, L. L.; SATO, D. N.; De CASTRO, S. L.; DURAN, N. 3-[4'-Bromo-(1,1'-biphenyl)-4-yl]-N,N,dimethyl-3-(2-thienyl)2-propen-1-amine: synthesis, cytotoxicity and leishmanicidal, trypanocidal and antimycobacterial activities. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 5, p. 629-637, 2002.

DICKINSON, J. M.; MITCHINSON, D. A. In vitro activity of new rifamycins against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and MAIS-complex mycobacteria. **Tubercle**, v. 68, n. 3, p. 177-182, 1987.

DROBNIEWSKI, F.; TAYLER, E.; IGNATENKO, N.; PAUL, J. L.; NYE, P.; LYAGOSHINA, T.; BESSE, C. Tuberculosis in Siberia: 1. An epidemiological and microbiological assessment. **Tuber. Lung Dis.**, v. 77, n.3, p. 199-206, 1996.

DYE C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P.; PATHANIA, V.; RAVIGLIONE, M. C. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. **JAMA**, v. 282, n. 7, p. 677-686, 1999.

EL BAGHDADI, J.; LAZRAQ, R.; IBRAHIMY, S.; BOUAYAD, Z.; GUINET, R.; BENSLIMANE, A. Survey of primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 1, n. 4, p. 309-313, 1997.

ESPINAL, M. A.; LAZLO, A.; SIMONSEN, L. et al. Global trends in resistance to anti-tuberculosis drugs. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1294-1303, 2001.

FOONGLADDA, S.; ROENGSAINTHIA, D.; ARJRATTANAKOOL, W.; CHUCHOTTAWORN, C.; CHAIPRASERT, A.; FRANZBLAU, S. G. Rapid and simple MTT method for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 6, n. 12, p. 1118-1122, 2002.

FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; McLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; FUENTES, P.; COOK, M. B.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; QUENZER, V. K.; FEERGUSON, R. M.; SHEEN, P.; GILMAN, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 2, p. 362-366, 1998.

GARCIA, M. L. G.; GÓMEZ, J. L. V.; SANCHO, M. C. G.; ÁLVAREZ, R. A. S.; ZACARIAS, F.; AMOR, J. S. Epidemiologia del SIDA y la tuberculosis. **Bol. Oficina Sanit. Panam.**, New York, v. 116, n. 6, p.546-564, 1994.

GERHARDT FILHO, G.; HIJJAR, M. A. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. **J. Pneumol.**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 4-10, 1993.

GOMEZ-FLORES, R.; GUPTA, S.; TAMEZ-GUERRA, R.; MEHTA, R. T. Determination of MIC's for *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric medium. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 5, p. 1232-1234, 1995.

HATFULL, G. F.; JACOBS, W. R. Jr. Mycobacteriophages: cornerstones of mycobacterial research. In: BLOOM, B.R. (ed.) **Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control**. Washington, American Society for Microbiology, 1994. p. 165-183.

HEIFETS, L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in Mycobacteriology. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 137, p. 1217-1222, 1988.

HOLT, J. G; KRIEG, N .R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. The mycobacteria. In: BERGEY'S manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 597-603.

INDERLIED, C. B.; SALFINGER, M. Antimicrobial agents and susceptibility tests: mycobacteria. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 6th ed., Washington: American Society for Microbiology, 1995. p. 1385-1404.

JACOBS Jr, W. R.; BARLETTA, R. G.; UDANI, R.; CHAN, J. KALKUT, G.; SOSNE, G.; TIESER, T.; SARKIS, G. J.; HATFULL, G. F.; BLOOM, B. R. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. **Science**, v. 260, n. 5109, p. 819-822, 1993.

JANUÁRIO, A. H.; FILHO, E. R.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. **Phytother. Res.**, v. 16, n. 5, p. 445-448, 2002.

KAKKAR, N.; SHARMA, M.; RAY, P.; SETHI, S.; KUMAR, S. Evaluation of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to primary anti tubercular drugs. **Indian J. Med. Res.**, v. 111, p. 168-171, 2000.

KANTOR, I. M.; LAZLO, A. Tuberculosis laboratory procedures for developing countries. In: GANGADHARAM, P. R. & JENKINS, P. A. **Mycobacteria. I Basic aspects**. New York: Chapman & Hall, 1998. p. 351-390.

KIM, S. J.; BAI, G. H.; HONG, Y. P. Drug-resistant tuberculosis in Korea, 1994. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 1, n. 4, p. 302-308, 1997.

KRITSKI, A. L.; MARQUES, M. J.; RABAHI, M. F.; VIEIRA, M. A.; WERNECK-BARROSO, E.; CARVALHO, C. E.; ANDRADE, G. de N.; BRAVO-de-SOUZA, R.; ANDRADE, L. M.; GONTIJO, P. P.; RILEY, L. W. Transmission of tuberculosis to close contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, v. 153, n. 1, p. 331-335, 1996.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 2520-2525, 2003.

LEE, C. H.; HEIFETS, L. B. Determination of minimal concentration of antituberculosis drug of radiometric and conventional methods. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. 349-352, 1987.

LEITE, C. Q. F.; BERETTA, A. L.; ANNO, I. S.; TELLES, M. A. S. Standardization of broth microdilution method for *Mycobacterium tuberculosis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 127-129, 2000.

LIAO, R. S.; RENNIE, R. P.; TALBOT, J. A. Comparative evaluation of a new carboxyfluorescein diacetate-modified microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 10, p. 3236-3242, 2002.

MACONDO, E. A.; BA, F.; GAYE-DIALLO, A.; TOURE-KANE, N. C.; KAIRE, O; GUEYE-NDIAYE, A; BOYE, C. S.; MBOUP, S. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT AST SIRE). **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 6, n. 7, p. 363-367, 2000.

McMACKEN, M.; CASTRO, K. G. La tuberculosis y el virus de la inmunodeficiencia humana en los Estados Unidos, 1985-1992. **Bol. Oficina Sanit. Panam.**, v. 117, n. 1, p. 77-83, 1994.

MELO, F. A. F. e AFIUNE, J. B. Quimioterapia da tuberculose: bases, condutas e procedimentos. **J. Pneumol.**, v. 19, n. 1, p. 42-49, 1993.

MITCHISON, D. A. Basic mechanisms of chemotherapy. **Chest**, v. 76, suppl. 6, p. 771-781, 1979.

MSHANA, R. N.; TADESSE, G.; ABATE, G.; MEORNER, H. Use of 3-{4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 5, p. 1214-1219, 1998.

MOORE, A. V.; KIRK, S. M.; CALLISTER, S. M.; MAZUREK, G. H.; SCHELL, R. F. Safe determination of susceptibility of *Mycobacterium*

tuberculosis to antimycobacterial agents by flow cytometry. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 3, p. 479-483, 1999.

MOR, N.; SIMON, B.; MEZO, N.; HEIFETS, L. Comparison of activities of rifapentine and rifampin against *Mycobacterium tuberculosis* residing in human macrophages. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 9, p. 2073-2077, 1995.

MOR, N.; SIMON, B.; HEIFETS, L. Bacteriostatic and bactericidal activities of benzoxazinorifamycin KRM-1648 against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* in human macrophages. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 6, p.1482-1485, 1996.

MUSSER, J. M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 4, p. 496-514, 1995.

NOLTE, F. S.; METCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**, 6th ed. Washington: American Society of Microbiology, 1995. p. 400.

NORDEN, M. A.; KURZYNSKI, T. A.; BOWND, S. E.; CALLISTER, S. M.; SCHELL, R. F. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by flow cytometry. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n. 5, p. 1231-1237, 1995.

NOVAK, S. M.; HINDLER, S.; BRUCKNER, D. A. Reability of two novel methods, Alamar and E test, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 11, p. 3056-3057, 1993.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

PABLO-MENDEZ, A; RAVIGLIONE, M. C.; LAZLO, A et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. **N. Engl. J. Med.** v. 338, p. 1641-1649, 1998.

PALOMINO, J. C.; PORTAELS, F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 18, n. 5, p. 380-383, 1999.

PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 335-338, 2000.

RANDO, D. G.; SATO, D. N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C. Q. F.; Do AMARAL, A. T.; FERREIRA, E. I.; TAVARES, L. C. Potential tuberculostatic agents. Topical application on benzoic acid [(5-nitrothiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, n. 3, p. 557-560, 2002.

RAVIGLIONE, M. C; DYE, C.; SCHMIDT, S.; KOCHI, A. WHO Global surveillance and monitoring project. Assessment of worldwide tuberculosis control. **Lancet**, v. 350, n. 9078, p. 624-629, 1997.

SALEM, J. I.; GOH, K. S.; LITAIFF, L. R. L.; CARCLOSO, M. S. L.; BRIGLIA, M. F. S. An investigation of primary and acquired drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazonas, Brazil). **J. Pneumol.**, v. 16, p. 6-8, 1990.

SALVAT, A; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001

SANCHEZ, L.; LONDONO, D.; ARANGO, A. I.; MATTAR, S. *In vitro* activity of antituberculous agents against *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Bogota, DC (Colombia) evaluated by the E-test. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 35, n. 2, p. 109-112, 1999.

SANTOS Jr, R. R.; BACHA, C. T. M.; BÖTTCHER, M.; ERRERA, M. C.; FRANZBLAU, S. G.; GARIBOTTI, D.; PRESOTTO, P.; SATO, D. N. Rapid screening of nicotinic acid derivatives for antimycobacterial activity by using microplate Alamar blue assay. In: CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGIA 8., 1998, Buenos Aires. **Anais...** [S. l.: s.n.], 1998.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão de Tuberculose. **Manual de orientação para coleta de escarro, e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose.** São Paulo, 2002, 26 p.

SATO, D. N. **Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.** 1998. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SATO, D. N.; SILVA, E. A. M.; PALACI, M.; UEKI, S. Y. M.; TELLES, M. A. S.; MARTINS, M. C.; LEITE, O. M. L. Susceptibilidade *in vitro* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à ciprofloxacina. **Rev. Latinoam. de Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 249-253, 1990.

SATO, D. N.; BACHA, C. T. M.; GARIBOTTI, D.; BÖTTCHER, M.; ERRERA, M. C.; PRESSOTO, P.; MELLES, C. E. A. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 25-31, 1999.

SATO, D. N.; AMORIM, A. B. R.; PINI, M. I. T.; CARAMICO, S. R.; TELLES, M. A. S. The use of MB/BacT system for *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility test for isoniazid and rifampicin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 36, suppl, 1, p. S24, 2001.

SHAWAR, R. M.; HUMBLE, D. J.; DALFSEN, J. M. V.; STOVER, C. K.; HICKEY, M. J.; STEELE, S.; MITSCHER, L. A.; BAKER, W. Rapid screening of natural products for antimycobacterial activity by using luciferase-expressing strains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium intracellulare*. **Antim. Ag. Chemother.**, v. 41, n. 3, p. 570-574, 1997.

SIDDIQI, S. H.; HEIFETS, L. B.; CYNAMON, M. H.; HOOPER, N. M.; LAZLO, A.; LIBONATI, J. P.; LINDHOLM-LEVY, P. J.; PEARSON, N. Rapid broth macrodilution method for determination of MICs for *Mycobacterium avium* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 9, p. 2332-2338, 1993.

SILVA, C. A.; SILVA, C. O. S.; ERRERA, M. C.; SANTOS Jr, R. R.; SATO, D. N. Rapid susceptibility testing for mycobacteria using the microplate Alamar blue assay. In: Congress of Pharmaceutical Sciences, 2nd, 1999, Ribeirão Preto. **Proceedings...** [S. l.: s.n.], 1999.

SILVA, E A. M.; SATO, D. N.; TELLES, M. A. S.; MARTINS, M. C.; PALACI, M.; UEKI, S. Y. M. Perfil de resistência de *Mycobacterium*

tuberculosis no Estado de São Paulo, 1986 a 1990. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 52, n. 1/2, p. 37-40, 1992.

SMEE, D. F.; MORRISON, A. C.; BARNARD, D. I.; SIDWELL, R. W. Comparison of colorimetric, fluorometric and visual method for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Viol. Methods**, v. 106, n. 1, p. 71-79, 2002.

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

SNIDER Jr, D. E.; KELLY, G. D.; CAUTHEN, G. M.; THOMPSON, N. J.; KILBURN, J. O. Infection and disease among contacts of tuberculosis cases with drug-resistant and drug-susceptible bacilli. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 132, n. 1, p. 125-132, 1985.

STEPHENS, C. E.; TANIOUS, F.; KIM, S.; WILSON, W. D.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R.; FRANZBLAU, S. G.; BOYKIN, D. W. Diguanidino and "reversed" diguanidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. **J. Med. Chem.**, v. 44, n. 11, p. 1741-1748, 2001.

SUNGKANUPARPH, S.; PRACHARTAM, R.; THAKKINSTIAN, A.; BUABUT, B.; KATATCHASAI, W. Correlation between susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by microtiter plate Alamar blue and clinical outcomes. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 85, n. 7, p. 820-824, 2002.

TELLES, M. A. S.; YATES, M. D. Single and double drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex and Mycobacteria other than the tubercle (MOTT) bacilli by a micro-dilution broth medium minimum

inhibitory concentration (MIC). **Tuberc. Lung. Dis.**, v. 75, n. 4, p. 286-290, 1994.

TELLES, M. A. S.; BORI, A.; AMORIN, A. B. R.; CRUZ, A. F.; PINI, M. I. T.; SATO, D. N. Rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* using the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1127-1131, 2002.

TENOVER, F. C.; CRAWFORD, J. T., HUEBNER, R. E.; GEITER, L. J.; HORSBURGH Jr, C. R.; GOOD, R. C. The resurgence of Tuberculosis: Is your laboratory ready? **J. Cl. Microbiol.** v. 31, n. 4, p. 767-770, 1993.

TIBALLI, R. N.; HE, X.; ZARINS, L. T.; REVANKAR, S. G.; KAUFFMAN, C. A. Use of colorimetric system for yeast susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 915-917, 1995.

TOMAN, K. **Tuberculosis: case-finding and chemotherapy. Questions and answers.** Geneva: World Health Organization, 1979.

TORTOLI, E.; MATTEI, R.; SAVARINO, A.; BARTOLINI, L.; BEER, J. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility testing performed with BACTEC 460TB (Becton Dickinson) and MB/BacT (Organon Teknika) systems. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 38, p. 83-86, 2000.

TUBERCULOSIS DRUG SCREENING PROGRAM. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.

TURNER, D. J.; HOYLE, S. L.; SNEWIN, V. A.; GARES, M. P.; BROWN, I. N.; YOUNG, D. B. An *ex vivo* model for screening drug

activity against *in vivo* phenotypes of *Mycobacterium tuberculosis*.

Microbiology, v. 148, p. 2929-2936, 2002.

ULUSOY, N. Synthesis and antituberculosis activity of cycloalkyllidenehydrazide and 4-aza-1-thiaspiro[4.5]decan-3-one derivatives of imidazo[2,1-b]thiazole. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 7, p. 565-571, 2002.

VARELDZIS, B. P.; GRASST, J.; KANTOR, I.; GROFTON, J.; LAZLO, A.; FELTEN, M.; RAVIGLIONE, M. C.; KOCHI, A. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. **Tuberc. Lung Dis.**, v. 75, n. 1, p. 1-7, 1994.

VENA, R. M.; MENSEN, E. L.; DeCOSTER, D. J.; CROKE, C. L.; FETT, D. B.; CALLISTER, S. M.; SCHELL, R. F. Flow citometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium avium* to amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin and rifabutin in 24 hours. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 6, n. 7, p. 368-375, 2000.

VISTICA, D. T.; SKEKAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.**, v. 51, n. 10, p. 2515-2520, 1991.

ZABRANSKY, R. J.; DINUZZO, A. R.; WOODS, G. L. Detection of vancomycin resistance in enterococci by the Alamar MIC system. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 791-793, 1995.

WALLACE Jr, R. J.; NASH, D. R.; STEELE, L. C.; STEINGRUBE, V. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by microdilution MIC method with 7H₉ broth. **J. Clin. Microbiol.**, v. 24, n. 6, p. 976-981, 1986.

WANGER, A.; MILLS, K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, and streptomycin by using Etest. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 7, p. 1672-1676, 1996.

YAJKO, D. M.; MADEJ, J. J.; LANCASTER, M. V.; SANDERS, C. A.; CAWTHON, V. L.; GEE, B.; BABST, A.; HADLEY, K. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 9, p. 2324-2327, 1995.

YAMAMOTO, S.; TOIDA, I.; WATANABE, N.; URA, T. *In vitro* antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 9, p. 2088-2091, 1995.

YEW, W. W.; TONG, S. C. W.; LUI, K. S.; LEUNG, S. K. F.; CHAU, C. H.; WANG, E. P. Comparison of MB/BacT system and agar proportion method in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 39, n. 4, p. 229-232, 2001.

YOUNG, D. B. Strategies for new drug development. In: BLOOM, B.R. **Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control**. Washington: American Society for Microbiology, 1994. p. 559-567.

8. ANEXOS

ANEXO I

Preparo dos meios de cultura

❖ Meio de cultura Middlebrook 7H9

O meio de cultura Middlebrook 7H9 foi preparado segundo orientação do fabricante, e adicionados de glicerol a 50% e de Tween 80 a 20% para evitar a formação de grumos de micobactérias durante o período de incubação em estufa a 37°C.

Para o preparo de 100 mL do meio de cultura foram utilizados:

Middlebrook 7H9	0,47g
Água destilada	90,0 mL
Tween 80 a 20%	250 µL

Glicerol a 50% 400 μ L

O meio foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos e, após o resfriamento, acrescentado 10,0 mL do suplemento OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica da luciferase utilizando o *M. tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1, o meio de cultura Middlebrook 7H9 foi acrescido de 50 μ L de higromicina a 100 mg/mL, de maneira a se obter uma concentração de 50 μ g/mL.

❖ Meio de cultura Middlebrook 7H10

Para o preparo de 100 mL do meio de cultura Middlebrook 7H10 utilizado na determinação da atividade biológica intracelular dos compostos testados, foram empregados:

Middlebrook 7H10 2,1 g
Água destilada 90,0 mL
Glicerol 1,0 mL

O meio de cultura foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos e, após o resfriamento, acrescentado 10,0 mL do suplemento OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), sendo a seguir, distribuído em placas estéreis divididas em 4 quadrantes. O meio de cultura Middlebrook 7H10 utilizado para a determinação das unidades formadoras de colônias de *M. tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1 foi acrescido de 50 μ L de higromicina a 100 mg/mL, de maneira a se obter uma concentração de 50 μ g/mL.