

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

Camila Maríngolo Ribeiro

Cinética bactericida de uma nova molécula benzofuroxânica combinada com antibióticos
utilizados para o tratamento de tuberculose

Araraquara

2017

Camila Maríngolo Ribeiro

Cinética bactericida de uma nova molécula benzofuroxânica combinada com antibióticos
utilizados para o tratamento de tuberculose

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara – UNESP
como parte dos requisitos da obtenção do
grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Araraquara

2017

Dedico àqueles que tornaram possível o sonho de fazer faculdade: meus pais.

Dedico àquele que completou minha vida ao chegar: meu amor.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por cada desafio que colocou em minha vida, pois sem estes desafios e suas dificuldades, não seria possível chegar até este momento e celebrar esta grande vitória. Vitória esta que coroa cinco anos de muitos sacrifícios e aprendizado, e é por isso que eu tenho que agradecer a todos aqueles que eu amo tanto, por que esta vitória não é só minha, mas também é da minha família.

Em especial, eu tenho que agradecer ao meu pai, que é o meu exemplo de caráter e de pai de família. Trabalhou muito para que pudesse me ver estudando em uma boa escola, depois em uma boa faculdade, agora me ver formada e poder dar à Bel as mesmas oportunidades que eu tive. Obrigada pai por cada noite que passou trabalhando, obrigada por cada dia que teve forças de chegar e logo em seguida sair de novo para trabalhar, obrigada por me ensinar com o seu exemplo que é trabalhando e me esforçando que eu vou ter conquistas.

Obrigada Mãe por ser o centro da nossa família, sem você nada funcionaria na nossa casa. Obrigada pelo amor, carinho e cuidado que teve comigo todos estes anos de faculdade e de vida.

Obrigada Bel, por ser a pessoa que veio como um presente de Deus tornar nossa família melhor, e por ser uma grande amiga para mim.

Obrigada meu amor por ser aquele que me completa e chegou para tornar a vida muito mais feliz, e claro, às vezes me dar os “puxões de orelha” que eu preciso. Obrigada por estar ao meu lado em momentos difíceis e por sempre me ouvir e me acalmar. Obrigada por me entender e me aconselhar, e acredite você é muito mais importante na minha vida do que eu consigo demonstrar, eu te amo muito. Obrigada pela Sophie, nossa cachorrinha, que veio completar nossa casa com alegria e algumas mordidinhas também.

Obrigada aos colegas de Laboratório, Dé, Mini, Érica, Edu, Paula, Leo, Miyata, Joás, Bel, Paty, Dé Bellato, Bia, Ana, Caio, Lê, Mari, Rachel, Bruna e Ana Paula pelos cafês, pelas conversas, pelos conselhos, pelo exemplo e por tudo o que me ensinaram.

Obrigada ao meu orientador Prof. Fernando, por ter sido um orientador presente e sempre disposto a ajudar e a desafiar. Obrigada pela confiança e pelo exemplo.

Obrigada a FAPESP (2013/1495-7 e 2014/03920-6) e a CNPQ pelo apoio financeiro.

Resumo

Tuberculose (TB) é a doença infecciosa que mais mata pessoas no mundo, atingindo 9,6 milhões de pessoas em 2014, e o mais agravante neste cenário é a emergência das cepas resistentes aos antibióticos disponíveis ao tratamento. Com o objetivo de encontrar novas moléculas potenciais anti-TB, em parceria com o Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, uma biblioteca de moléculas foi sintetizada baseadas nos núcleos furoxânicos e benzofuroxânicos. A concentração inibitória mínima e citotoxicidade das moléculas desta biblioteca foram determinadas. Para avaliar o perfil das três moléculas que mais se destacaram (14c, PJ5 e PJ21), utilizamos a metodologia da cinética bactericida. As moléculas 14c e PJ21 apresentaram efeito bactericida superior a antibióticos já empregados na terapia. A molécula PJ 5 é bacteriostática e é a que apresenta o maior índice de seletividade, por este motivo foi selecionada para ser avaliada em combinação com antibióticos já empregados na terapia anti-TB. Os resultados da combinação com fármacos, foi de efeito sinérgico com isoniazida, rifampicina e amicacina, e um efeito bactericida precoce com MOX, em que em pouco tempo de exposição, o inóculo foi totalmente eliminado pela ação da combinação de antibióticos. Como a terapia anti-TB é sempre uma politerapia, antibióticos que apresentam efeito sinérgico quando combinados com outros se destacam como potenciais futuros fármacos. O efeito potencializador, observado para o PJ5, talvez possa ser observado em outras moléculas da mesma classe química.

Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that kills more people in the world, 9.6 million people affected by 2014, and 1.5 million deaths. The major aggravating factor in this scenario is the emergence of antibiotic-resistant strains available for treatment. To find new potential anti-TB molecules, in partnership with the Laboratory of Research and Development of Medicines, a library of molecules based on the furoxanic and benzofuroxanic nuclei was synthesized. A minimal inhibitory concentration and a cytotoxicity of the molecules of this library were determined. To evaluate the profile of the three most prominent molecules (14c, PJ5 and PJ21), a bactericidal kinetics methodology was used. The molecules 14c and PJ21 had a bactericidal effect superior to the antibiotics used in the therapy. The PJ 5 molecule is bacteriostatic and has the highest index of selectivity, so it was selected to be evaluated in combination with antibiotics used in anti-TB therapy. The results of the combinations were a synergistic effects with isoniazid, rifampicin and amikacin, and an early bactericidal effect with MOX, and the inoculum was completely eliminated with all combination of PJ5 with antibiotic. Anti-TB therapy is always a drugs association, antibiotics that have a synergistic effect when combined with others stand out as potential future drugs. The potentiating effect observed for PJ5 suggests that it can be observed with other molecules of the same chemical class.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Porcentagem de novos casos de TB diagnosticados como MDR.	11
Figura 2. Número de novos casos de TB laboratorialmente confirmados como XDR.	11
Figura 3. Estruturas moleculares dos fármacos isoniazida, rifampicina, amicacina e moxifloxacino.....	13
Figura 4. Esquema geral de síntese dos compostos furoxânico.	18
Figura 5. Molécula 14c (E)-4-(4-((2-isocotinoilhidrazona)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazil 2-óxido).	20
Figura 6. Esquema de síntese para obtenção dos derivados furoxânicos.	21
Figura 7. Molécula PJ 5 e PJ 21, respectivamente.	22
Gráfico 1. Curva de morte dos compostos PJ5, PJ21 e 14c de acordo com o tempo.....	26
Gráfico 2. Comparação entre a molécula 14c e os fármacos utilizados como controle (AMK, RFP, INH e MOX).	27
Gráfico 3. Comparação entre a molécula PJ5 e os fármacos utilizados como controle (AMK, RFP, INH e MOX).	28
Gráfico 4. Comparação entre a molécula PJ21 e os fármacos utilizados como controle (AMK, RFP, INH e MOX).	29
Gráfico 5. Cinética bactericida de PJ 5 em combinação com RFP.	30
Gráfico 6. Cinética bactericida de PJ 5 em combinação com INH.	33
Gráfico 7. Cinética bactericida de PJ 5 em combinação com AMK.	33
Gráfico 8. Cinética bactericida de PJ 5 em combinação com MOX.	35

Lista de abreviaturas e siglas

AMK - Amicacina
BDQ - Bedaquilina
CIM₉₀ - Concentração inibitória mínima
ETB - Etambutol
ETH - Etionamida
GFX - Gatifloxacino
IC₅₀ - Índice de citotoxicidade
INH – Isoniazida
IS – Índice de seletividade
KAN - Canamicina
LFX - Levofloxacino
MDR-TB – Tuberculose multidroga resistente
MOX - Moxifloxacino
NO - Óxido nítrico
OFX - Ofloxacino
OMS – Organização Mundial da Saúde
PZA - Pirazinamida
REMA - *Rezasurin microtiter assay*
RFP - Rifampicina
STP - Streptomina
TB – Tuberculose
TDR-TB – Tuberculose totalmente resistente a fármacos
UFC – Unidades Formadoras de Colônia
XDR-TB – Tuberculose extensivamente droga resistente

Sumário

Introdução	9
Tuberculose.....	9
Compostos Furoxânicos e Benzofuroxânicos	17
Desenvolvimento	23
Objetivos	23
Objetivos Gerais	23
Objetivos Específicos	23
Material e método	23
Material	24
Método	24
Resultados e Discussão	25
1. Comportamento cinético de 14c, PJ5 e PJ21	25
2. Comparação do comportamento cinético dos compostos 14c, PJ5 e PJ21 com antibióticos empregados na terapia anti-TB.....	26
3. Comportamento cinético da combinação de PJ5 com antibióticos empregados na terapia anti-TB.....	29
Conclusão	35
Referências Bibliográficas.....	36

Introdução

Tuberculose

Tuberculose (TB) é atualmente a doença infecciosa que mais mata pessoas no mundo, superando o HIV. Trata-se de uma doença infecciosa bacteriana causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e que atinge principalmente os pulmões, mas que pode se disseminar por outros órgãos. Em 2014 segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 9,6 milhões de pessoas contraíram esta doença no mundo, e destes 1,5 milhão morreu devido à doença (1,1 milhão HIV-negativo e 0,4 milhão HIV-positivo) (OMS, 2015).

No *ranking* mundial o Brasil ocupa a 18ª posição em relação ao número de infectados com TB, em 2015, foram 75.526 casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Quando a doença se instala o esquema terapêutico básico empregado para o tratamento, no Brasil, é composto por uma fase intensiva (2 meses de Rifampicina (RFP), Isoniazida (INH), Pirazinamida (PZA) e Etambutol (ETB)) seguido de uma fase de manutenção (4 meses de RFP e INH) totalizando seis meses de tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Há cinquenta anos surgiu a terapia multidrogas para tratar TB que foi largamente empregada para responder a emergência da resistência aos antibióticos (OMS, 2010).

Dos 75.526 casos de TB notificados no Brasil, 12.337 foram casos recidivos de TB, ou seja, aqueles que já receberam algum tratamento e não obtiveram sucesso, e este número representa 16,3% do total. A falha no tratamento ocorre, principalmente, devido ao abandono da terapia antes do período determinado, ou seja, não se obtém a cura e após um período a doença volta a se manifestar ou devido à resistência aos antibióticos utilizados, o que se agrava ainda mais quando não há adesão ao tratamento. A OMS preconiza que o percentual de abandono da terapia deva ser menor que 5%, no entanto no Brasil, em média,

11% dos pacientes abandonam o tratamento, com exceção do Acre e do Amapá que apresentam percentuais menores que 5% (OMS, 2015) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A classificação da resistência é feita com base nos antibióticos de primeira linha (RFP e INH) ou de segunda linha (fluoroquinolonas e antibióticos injetáveis). MDR-TB são cepas classificadas como multidroga resistentes, que são resistentes a pelo menos dois antibióticos de primeira linha para o tratamento: RFP e INH. Já as cepas XDR-TB são chamadas de extensivamente resistentes e classificadas assim quando há resistência a RFP, INH, a uma fluoroquinolona (por exemplo: ofloxacino (OFX), levofloxacino (LFX), moxifloxacino (MOX) e gatifloxacino (GFX)) e pelo menos um antibiótico injetável de segunda linha (por exemplo: amicacina (AMK), canamicina (KAN) ou capreomcina)(OMS, 2010).

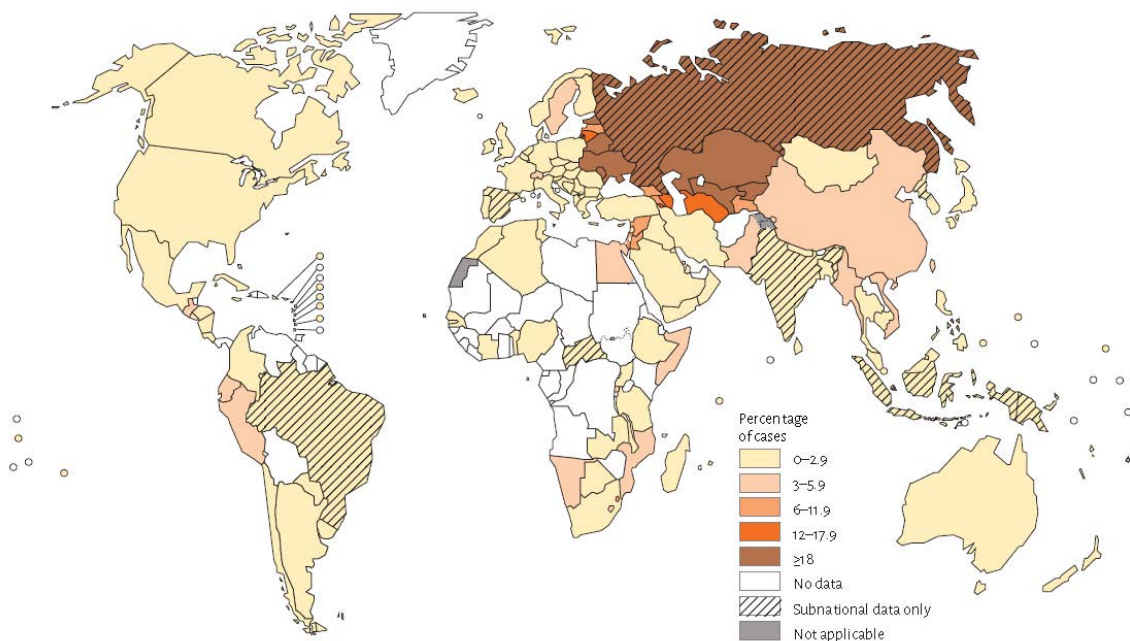
Estima-se que, no mundo, 3,3% dos novos casos de TB e que 20% das recidivas são casos de MDR-TB. Casos recidivos são pacientes que já receberam algum tratamento, mas não foram curados, por ineficácia do tratamento ou por abandono da terapia. A figura 1 mostra a distribuição mundial dos casos de MDR-TB, segundo a OMS. Dentro desta problemática, devemos destacar que muitos países são classificados como: dados ausentes, ou seja, a situação real pode ser ainda mais grave que a relatada, já que nem todos os países têm os dados epidemiológicos necessários (OMS, 2015).

Em relação às XDR-TB, estas cepas já foram relatadas em 105 países e estima-se que 9,7% das MDR-TB sejam na verdade XDR-TB, mas que não foram corretamente diagnosticadas, provavelmente por limitações técnico-científicas e financeiras dos sistemas de saúde. Na figura 2, apresenta-se a distribuição mundial dos casos confirmados laboratorialmente de XDR-TB, observa-se que alguns países não tiveram cepas XDR-TB confirmadas laboratorialmente e que alguns países não apresentaram dados de casos de XDR-

TB, novamente, podendo subestimar a real situação dos casos de XDR-TB no mundo (OMS, 2015).

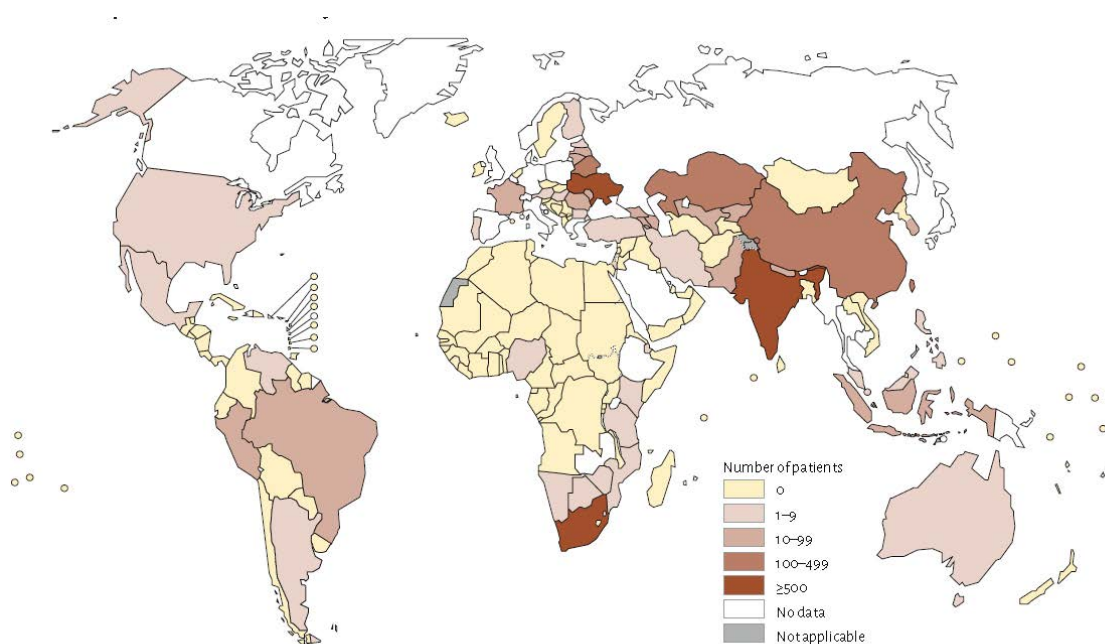
Figura 1. Porcentagem de novos casos de TB diagnosticados como MDR.

Percentage of new TB cases with MDR-TB^a



(Fonte: OMS , 2015)

Figura 2. Número de novos casos de TB laboratorialmente confirmados como XDR.



(Fonte: OMS , 2015)

Além dos isolados clínicos XDR-TB, no Irã em 2009, foram relatados 15 isolados clínicos resistentes a INH, RFP, estreptomicina (STP), ETB, PZA, etionamida (ETH), ácido para-aminosalicílico, cicloserina, OFL, AMK e ciprofloxacino. Estes isolados clínicos foram classificados como totalmente resistente a antibióticos (TDR-TB) mostrando que as alternativas terapêuticas disponíveis estão cada vez menos eficientes (VELAYAT, et al., 2009).

Os mecanismos desenvolvidos pelos microrganismos para evadir dos antibióticos empregados no tratamento são classificados em quatro: 1. Modificação do alvo do antibiótico; 2. Modificação da via de ativação ou metabolização dos antibióticos (especialmente relevante para os pró-fármacos); 3. Redução da permeabilidade dos antibióticos (devido à alta lipofilicidade da parede celular micobacteriana ou à ação de bombas de efluxo) ou 4. Inativação dos antibióticos por ação enzimática (COHEN, et al., 2014).

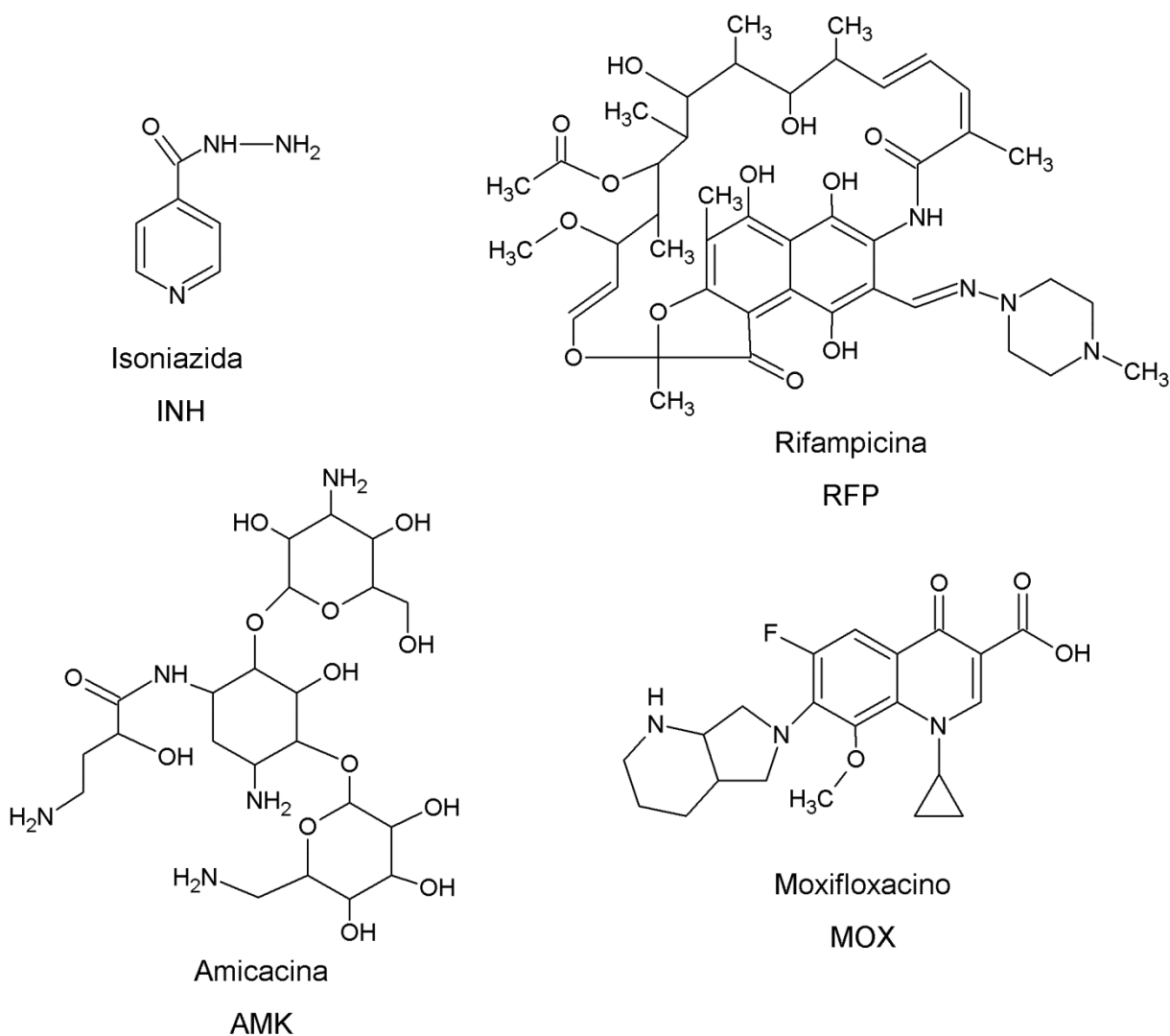
A modificação molecular dos alvos terapêuticos é consequência de mutações no DNA bacteriano. Sendo assim, serão descritos os mecanismos de ação e as principais mutações associadas à resistência para os quatro antibióticos escolhidos para este trabalho INH e RFP, que são antibióticos de primeira linha, e MOX e AMK, que são de segunda linha. As estruturas moleculares destes antibióticos estão apresentadas na figura 3.

Uma importante definição quanto aos antibióticos é em relação ao seu mecanismo de ação, que pode ser bactericida, ou seja, aquele capaz de matar os microrganismos, ou bacteriostático que é aquele capaz de impedir a multiplicação dos microrganismos (TORTORA, et al., 2010).

A RFP apresenta um efeito bactericida em bactérias replicantes e em bactérias com baixo metabolismo (referente ao estágio de latência que o bacilo passa dentro do macrófago) (MITCHISON, 1979). RFP é um inibidor da subunidade β da RNA polimerase

dependente de DNA, então a transcrição é prejudicada pela ação da RFP, bem como a tradução, que é a síntese de proteínas baseada no RNA (YAMADA, et al., 1985).

Figura 3. Estruturas moleculares dos fármacos isoniazida, rifampicina, amicacina e moxifloxacino.



(Fonte: autora).

A resistência a RFP é causada por mutações no gene *rpoB* que codifica a subunidade β da RNA polimerase. Essas mutações resultam em uma proteína com uma conformação alterada e com reduzida afinidade com o antibiótico. As principais mutações descritas são nas posições 531, em que uma serina pode ser substituída por leucina, glutamina

ou triptofano e, na posição 526, uma histidina pode ser substituída por tirosina, ácido aspártico, arginina, asparagina, prolina ou glutamina. Adicionalmente, já foram descritas mutações nas posições 533, 522, 518, 516, 513, 511, entre outras resultando em resistência a RFP (TELENTI, et al., 1993).

A RFP pertence à classe das rifamicinas. Rifabutina, rifapentina e rifalazil são antibióticos que pertencem à mesma classe. Para cepas com mutações nos códons 531 e 526, observa-se uma resistência cruzada para todas as rifamicinas. Entretanto, o mesmo não é observado para mutações no códon 516 que resultam em resistência a RFP e rifapentina, mas não a rifabutina e rifalazil (WILLIAMS, et al., 1998).

A INH é um pró-fármaco dependente da ativação pela enzima KatG (uma enzima catalase peroxidase codificada pelo gene *katG*). Com a ação da KatG, a INH libera radicais hidrazil isonicotínico e acil isonicotínico que se ligam a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) formando adutos. Estes adutos se ligam e inibem a enzima carreadora enoil-acil redutase dependente de NADH. Esta enzima é chamada de InhA (codificada pelo gene *inhA*) e é responsável pela síntese de ácidos micólicos, pois faz a elongação das cadeias de ácido graxo. Os ácidos micólicos são os maiores lipídeos do envelope celular micobacteriano (MARRAKCHI, et al., 2000).

A mutação mais frequente que leva a resistência a INH é a mutação no códon 315 em *katG*, em que uma serina pode ser substituída por treonina (93,4%), asparagina, isoleucina, arginina ou glicina. Esta mutação está presente em 64% de todos os casos de isolados clínicos fenotipicamente resistentes. Mutações nas posições 306, 316, 309, 311, 299, 275, 328, 155 e 110 também já foram reportadas como responsáveis pela resistência a INH (SEIFERT, et al., 2015).

A segunda causa mais frequente de resistência a INH é a mutação no gene *inhA*, sendo que podem ocorrer mutações tanto na região promotora quanto na região codificadora

do gene. Mutações na região promotora levam a uma superexpressão de InhA, enquanto mutações na região codificadora levam a um bloqueio da ligação do aduto (INH+NAD). Mutações no gene *inhA*, considerando tanto a região promotora quanto codificadora, estão presentes em cerca de 19% dos casos de resistência fenotípica a INH e pode acontecer nas regiões -15 (mais frequente), -8,-47 ou -17 da região promotora ou pode ser em 94, 21,194, 3, 258 ou 190 na região codificadora do gene (SEIFERT, et al., 2015).

A região intergência de *ahpC-oxyR* é a região promotora de *ahpC* e mutações nesta região já foram reportadas em mutantes resistentes a INH, pois causam uma superexpressão deste gene. *ahpC* codifica a enzima alquil hidroxiperoxido redutase. Bacilos que possuem o gene *katG* mutado, e consequentemente com a enzima KatG alterada, tem um desbalanço nas espécies reativas de oxigênio, podem ter uma mutação em *ahpC* para compensar a falta da atividade antioxidante de KatG. Esta mutação, em *ahpC*, é menos frequente em isolados clínicos resistentes a INH, no entanto, ela pode acontecer simultaneamente com outras em *inhA* ou *katG* (SHERMAN, et al., 1999) (SHERMAN, et al., 1996) (KELLEY, et al., 1997).

MOX, utilizada neste trabalho e as demais fluoroquinolonas, como: levofloxacino, ciprofloxacino e gatifloxacino, atuam inibindo a enzima DNA girase, que atua durante a replicação do DNA e é fundamental para que esse processo aconteça. A DNA girase tem duas subunidades A e B, que são codificadas respectivamente pelos genes *gyrA* e *gyrB* (COLE, et al., 1998). Mutações nos códons 88, 90, 91 e 94 de *gyrA* podem resultar cepas resistentes a fluoroquinolonas. Alguns exemplos de mutações que levam a um alto nível de resistência são: a troca de uma alanina por uma valina na posição 90, e a troca de um aspartato por uma glicina, asparagina ou alanina na posição 94 (TAKIFF, et al., 1994). Mutações apenas no gene *gyrB* também são detectadas, mas sua relação com a resistência a fluoroquinolonas não é

totalmente estabelecida, no entanto já é bem descrito que a associação de mutações em *gyrA* e *gyrB* conferem níveis maiores de resistência (LI, et al., 2014)..

Os aminoglicosídeos, como a AMK, utilizada neste trabalho, KAN e estreptomicina, ligam-se a subunidade 30S do ribossomo micobacteriano inibindo a síntese proteica (PALOMINO, et al., 2014). Mutações no gene *rrs*, que codifica o RNA ribossomal levam a resistência a esta classe de fármacos. AMK apresenta um alto nível de resistência cruzada com KAN, a mutação mais frequente que leva a esta resistência é troca de uma adenina por uma guanina na região 1400 no rRNA 16S (ALANGADEN, et al., 1998).

Uma enzima acetiltransferase (codificado pelo gene *eis*, que é uma proteína intracelular relacionada à sobrevivência (*enhanced intracellular survival protein*)) é capaz de modificar estruturalmente os aminoglicosídeos reduzindo sua afinidade com o ribossomo. Mutações na região promotora de *eis*, e que levam ao aumento na expressão dessa proteína, tem sido descritas como responsáveis por um baixo nível de resistência a AMK e principalmente a KAN (ZAUNBRECHER, et al., 2009) (JNAWALI, et al., 2013).

7-metilguanossina metiltransferase, codificada pelo gene *gidB*, modifica resíduos de guanina no RNA ribossomal 16S. Mutações no gene *gidB* que levam a perda de função desta enzima alteram a molécula do 16S e sua conformação, consequentemente reduzindo a afinidade de ligação dos aminoglicosídeos e por isso resultam em resistência aos fármacos desta classe (OKAMOTO, et al., 2007).

Há mais de 40 anos não eram desenvolvidos novos medicamentos para o tratamento de TB, a última classe que havia sido desenvolvida era a das rifamicinas, que inclui um dos principais fármacos empregados no tratamento, a RFP. Recentemente, foi introduzido um novo fármaco no mercado: a Bedaquilina, cujo nome comercial é Sirturo®, no entanto, antibiótico ainda está em Teste Clínico de Fase III e deverá ser usada para tratar apenas casos de MDR-TB e XDR-TB, embora também tenha ação para cepas sensíveis. Este

medicamento apresenta alta toxicidade e deve ser utilizado como último recurso no tratamento, com o objetivo de reduzir a seleção de cepas resistentes (LEIBERT, et al., 2014).

A bedaquilina (BDQ) é uma diarilquinolona que atua ligando-se a um domínio transmembrana da enzima Adenosina Trifosfato Sintase (ATP Sintase) presente na parede do *M. tuberculosis*, interrompendo a rotação central da bomba de prótons, e por consequência, interrompendo a produção de ATP pela bactéria, sendo este um novo mecanismo de ação de fármacos anti-TB. A BDQ tem atividade contra várias espécies de micobactérias e embora seja um fármaco novo, já se observa resistência através da mutação dos aminoácidos 63 e 66, que quando mutados impedem a ligação do fármaco em seu alvo que é o aminoácido 61 (ANDRIES, et al., 2005) (PETRELLA, et al., 2006) (LEIBERT, et al., 2014).

Diante deste cenário de emergência de cepas resistentes aos fármacos disponíveis para o tratamento, destaca-se a necessidade da descoberta de novos fármacos e de combinações mais ativas tanto de novos compostos quanto dos fármacos já empregados na terapia (MACINGWANA, et al., 2012).

Compostos Furoxânicos e Benzofuroxânicos

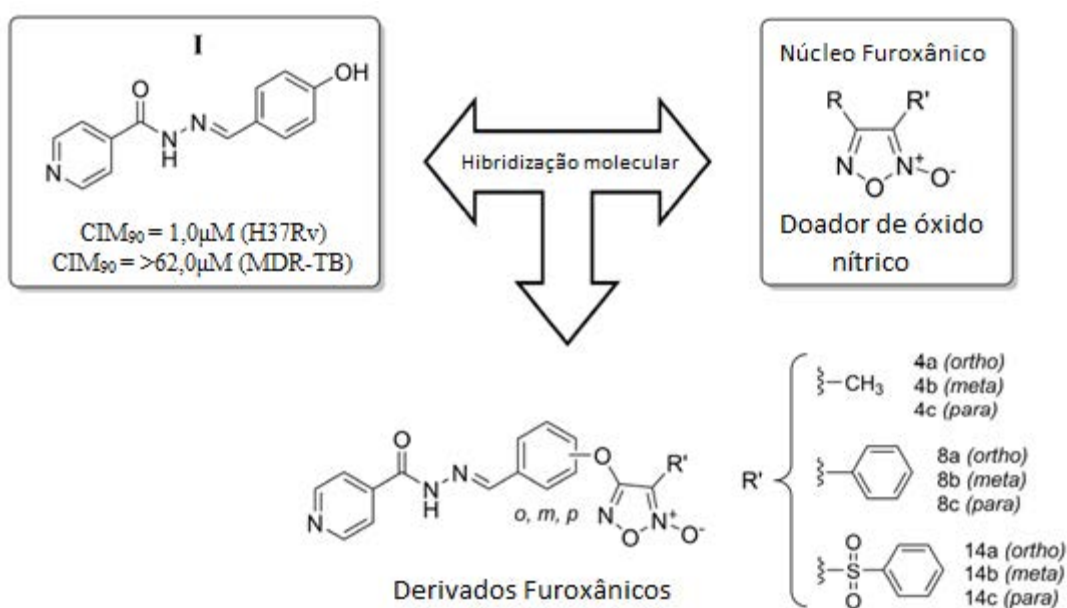
Com o objetivo de sintetizar novas moléculas com potencial anti-TB, em 2011 iniciou-se uma colaboração com o LAPDESF (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Após diversos estudos percebeu-se o potencial de uma determinada classe de compostos que possuía poucos estudos terapêuticos, assim, uma biblioteca de compostos furoxânicos e benzofuroxânicos foram desenhados, sintetizados e sua atividade anti-TB avaliada.

Os compostos furoxânicos e benzofuroxânicos foram idealizados por sua capacidade de doação de óxido nítrico (NO), devido à presença do núcleo furoxânico, conforme a figura 4.

Os macrófagos usam destas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio para tentar combater a infecção por *M. tuberculosis* e outras bactérias, pois o NO difunde-se para a célula do parasita dentro do fagolisossomo, onde exerce efeitos citotóxicos através de inúmeros mecanismos (VOSKUIL, et al., 2003) (GASCO, et al., 2004).

Além disso, os compostos doadores de NO tem a atividade farmacológica de atenuar a aderência dos leucócitos e de estimular a enzima solúvel Guanilato Ciclase na resposta imunológica citotóxica por leucócitos (CERECETTO, et al., 2005).

Figura 4. Esquema geral de síntese dos compostos furoxânico.



(Fonte: Fernandes, et al., 2016b modificado)

Os compostos furoxânicos já tem algumas atividades biológicas identificadas, como por exemplo: atividade antimicobacteriana (HERNÁNDEZ, et al., 2013), antichagásica (SERAFIM, et al., 2014) e antileishmania (DUTRA, et al., 2014).

A síntese da biblioteca de compostos furoxânicos foi baseada em hibridização molecular, conforme descrito na figura 4 (FERNANDES, et al., 2016a e FERNANDES, et al., 2016b).

A atividade antimicobacteriana *in vitro* frente ao *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foi determinada através do método do *Rezasurin microtiter assay* (REMA), no qual se utiliza microdiluição em placas de 96 poços e utiliza-se a resazurina como revelador da viabilidade celular. Desta forma se determina a concentração inibitória mínima (CIM₉₀), ou seja, a menor concentração do composto capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano (PALOMINO, et al., 2002). Valores de CIM₉₀ abaixo de 10 µg/mL são considerados promissores.

O índice de citotoxicidade (IC₅₀) também foi determinado por um método de microdiluição em placas de 96 poços e utilizando resazurina como revelador de viabilidade celular. O IC₅₀ representa a menor concentração de composto capaz de manter 50% das células viáveis, desta forma, quanto maior esta concentração, menos tóxico é o composto (PAVAN, et al., 2010). Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas duas linhagens celulares MRC-5 (células normais derivadas de tecido pulmonar humano) e J774A.1 (células macrofágicas de murinos) (FERNANDES, et al., 2016b).

Com os valores da CIM e do IC₅₀, calcula-se o índice de seletividade (IS = IC₅₀/CIM₉₀). As moléculas que apresentarem IS maior ou igual a 3 são consideradas promissoras, pois indica que a concentração em que o composto não exerce efeito citotóxico é três vezes superior a que concentração que inibe o crescimento micobacteriano (ORME, 2001).

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM), índice de citotoxicidade (IC₅₀) e índice de seletividade estão apresentados na tabela 1.

A molécula 14c, apresentada na figura 5, foi considerada a molécula mais promissora desta classe, por apresentar uma CIM de 1,03 μM e IS maior que 10.

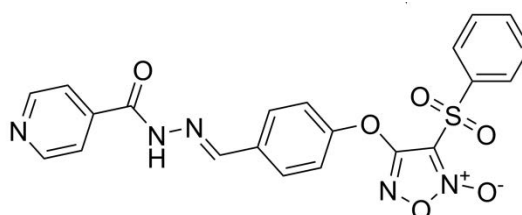
Tabela 1. Concentração inibitória mínima, índice de citotoxicidade e índice de seletividade para os derivados furoxânico.

Composto	CIM ₉₀ (μM)	IC ₅₀ (μM) MRC-5	IS	IC ₅₀ (μM) J774A.1	IS
4a	> 62.0	ND	ND	ND	ND
4b	> 62.0	ND	ND	ND	ND
4c	> 62.0	ND	ND	ND	ND
8a	> 62.0	ND	ND	ND	ND
8b	> 62.0	ND	ND	ND	ND
8c	11.82	623.44	52.74	408.97	34.78
14a	8.60	34.40	3.78	10.75	1.25
14b	1.61	30.10	14.13	4.30	3.00
14c	1.03	43.01	20.29	10.75	11.98

ND = não determinado

(Fonte: Fernandes, et al., 2016b).

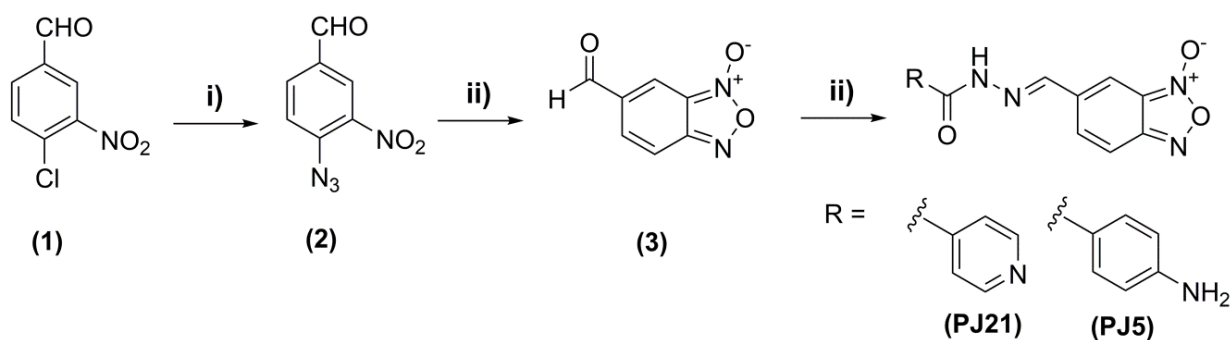
Figura 5. Molécula 14c (E)-4-(4-((2-isocotinoilhidrazona)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazil 2-oxido).



(Fonte: FERNANDES, et al., 2016b)

Além dos derivados furoxânicos outra classe de compostos foi sintetizada, no entanto esta classe não possui o núcleo furoxânico, mas sim um núcleo benzofuroxânico, que dá nome a classe. Os dados obtidos referente a esta classe ainda não foram publicados, por isso, neste trabalho são apresentados apenas os dados referentes às moléculas utilizadas. O esquema de síntese está apresentado na figura 6.

Figura 6. Esquema de síntese para obtenção dos derivados furoxânicos.



i) NaN_3 , DMSO, 75 °C, 1h; ii) tolueno, refluxo, 2h; iii) etanol, isoniazida ou 4-aminobenzidrazida, ácido acético, 12h, t.a.

(Fonte: FERNANDES, 2016a)

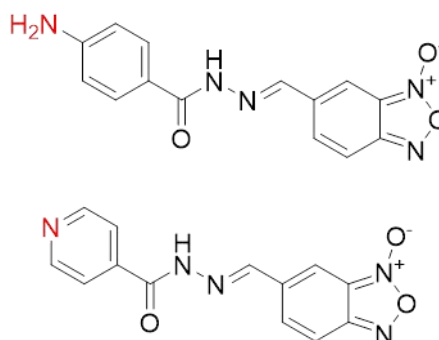
Todas as moléculas foram caracterizadas por determinação da faixa de fusão, análise de espectrofotometria de absorção no infravermelho e ressonância magnética nuclear utilizando H^1 e C^{13} . A pureza dos compostos foi avaliada por cromatografia líquida de alta pressão e a análise elementar encontrada foi superior a 99% (FERNANDES, et al., 2016a) (FERNANDES, et al., 2016b).

Da série das moléculas benzofuroxânicas, as denominadas PJ21 e PJ5, apresentadas na figura 7, foram as que mais se destacaram, conforme apresentado na tabela 2 (Dados não publicados).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima, índice de citotoxicidade e índice de seletividade das duas moléculas benzofuroxânicos PJ5 e PJ21 (Dados não publicados).

Composto	Peso molecular (g/mol)	CIM ₉₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µM)	IC50 VERO (µg/mL)	IC50 VERO (µM)
PJ 5	297,26	8,3	27,92	>500,00	1682,03
PJ 21	283,24	5,84	20,62	84,30	297,63

Figura 7. Molécula PJ 5 e PJ 21, respectivamente.



(Fonte: FERNANDES, 2016b)

Dos dados apresentados, as moléculas PJ5 e PJ 21 (derivados benzofuroxânicos) e 14c (derivado furoxânico) destacam-se por apresentarem alto IS, ou seja, sua concentração capaz de inibir o crescimento micobacteriano é menor que a concentração em que apresenta efeitos citotóxicos.

Além de encontrar moléculas com potencial anti-TB e com baixa toxicidade é importante que estas moléculas não interajam negativamente com outros fármacos empregados no tratamento, pois a terapia anti-TB utiliza mais de um antibiótico com o objetivo de prevenir a emergência de cepas resistentes e melhorar a eficácia do tratamento, de forma a minimizar o tempo e os efeitos tóxicos do tratamento (MACINGWANA, et al., 2012). Utilizando a metodologia de cinética bactericida é possível determinar se uma

molécula apresenta efeito bactericida ou bacteriostático e se há um efeito sinérgico, aditivo ou indiferente quando fármacos são combinados.

Desenvolvimento

Objetivos

Objetivos Gerais

Avaliar a cinética bactericida de três moléculas com potencial anti-TB e avaliar se a combinação de uma delas com antibióticos já empregados na terapia anti-TB apresenta interação sinérgica.

Objetivos Específicos

- Avaliar a cinética bactericida de três compostos potenciais anti-TB (PJ5, PJ21 e 14c);
- Classificar sua ação em bactericida ou bacteriostático;
- Selecionar a molécula com maior índice de seletividade (PJ5) para avaliar sua cinética bactericida em combinação com RFP, INH, AMK e MOX;
- Classificar a interação de PJ5 com os fármacos em efeito sinérgico, indiferente ou antagônico.

Material e método

A fim de avaliar o perfil bactericida de um fármaco ou combinações de fármacos é utilizada a metodologia de cinética bactericida, em que um inóculo bacteriano é exposto a um fármaco ou combinação de fármacos e é analisado o decaimento do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de acordo com o tempo.

Material

Fármacos

As soluções de INH e AMK foram preparadas em água e filtradas para esterilização, já as soluções de RFP, MOX, 14c, PJ5 e PJ21 foram preparadas com dimetilsulfóxido. Todas as soluções foram preparadas a 10 mg.mL^{-1} , congeladas a -20°C e diluídas nas concentrações necessárias no momento do uso.

As concentrações utilizadas foram duas vezes maior que a CIM_{90} , determinada pelo ensaio de REMA (padronizado por PALOMINO, et al., 2002), a saber: AMK = $0,25 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; RFP = $0,008 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; INH = $0,10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; MOX = $0,354 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; 14c = $0,96 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; PJ21 = $11,68 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e PJ5 = $16,6 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Bactéria

A suspensão de bacilos *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) é preparada a partir de um inóculo em escala McFarland igual a 1,0 (Utiliza-se o densitômetro DEN-1, Biosan, comprimento de onda = $565 \pm 15 \text{ nm}$) diluído 20 vezes. Desta forma a concentração inicial de bactérias deve ser próxima a 10^6 UFC.mL^{-1} (LUNA-HERRERA, et al., 1995) (BHUSAL, et al., 2005).

Método

Foram utilizados *erlenmeyers* de 125mL, contendo um volume de 50mL da suspensão bacilar, onde se adicionaram os antibióticos sozinhos e em combinação com o PJ5, e utilizou-se um *erlenmeyer* apenas com a suspensão bacteriana, sem adição de fármaco, que é o controle de crescimento do experimento. Foram incubados a 37°C em *shaker* e alíquotas foram regularmente recuperadas a cada 48h durante 14 dias.

Fez-se uma diluição seriada decimal e alíquotas de 100 μL de cada diluição foram semeadas em placas contendo em ágar 7H10 suplementado com OADC (meio sólido para contagem de UFC). As placas foram incubadas por um período de até 30 dias a 37°C , com 5% de CO_2 , para contagem das colônias. O experimento foi realizado em triplicata biológica e os resultados expressos em $\text{Log}_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ (média aritmética e desvio padrão). Com os valores obtidos traçou-se uma curva representando o número de bactérias viáveis em $\text{Log}_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ (ordenada) em função do tempo de exposição em dias (abscissa).

Combinações de fármacos que reduziram a quantidade de micobactérias em 2 ou mais $\text{Log}_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$, em relação ao fármaco mais ativo, foram consideradas sinérgicas. Combinações de fármacos que reduziram a quantidade de micobactérias em menos que 2 $\text{Log}_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ foram consideradas aditivas ou indiferente. Caso a redução da morte na combinação de fármacos tenha sido 2 vezes menor que a contagem de $\text{Log}_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ do antibiótico sozinho, considera-se um efeito antagônico (PILLAI, et al., 2005).

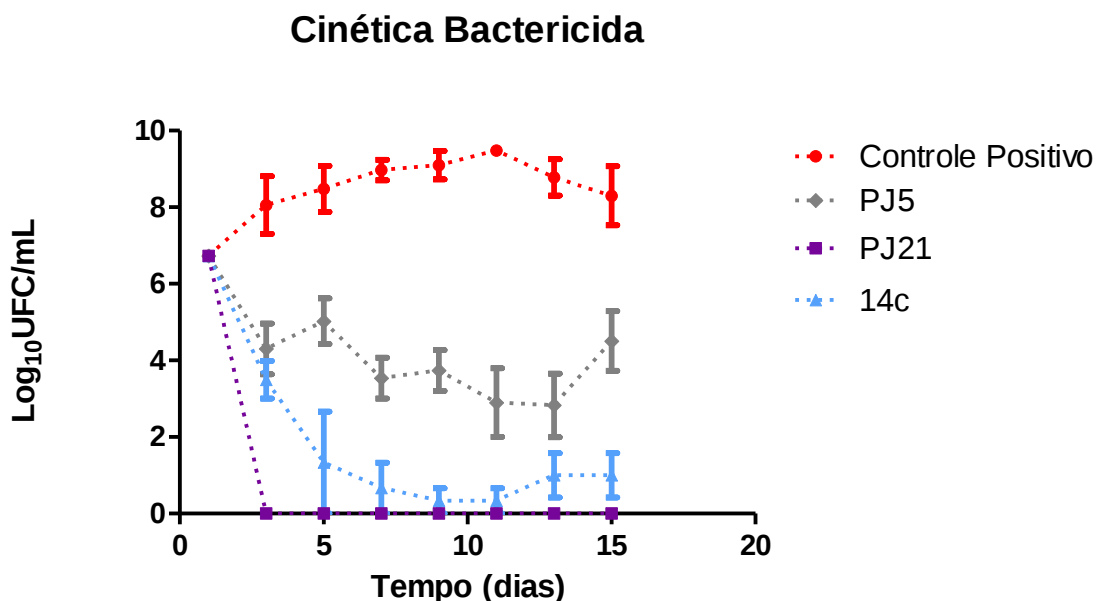
Resultados e Discussão

1. Comportamento cinético de 14c, PJ5 e PJ21

O gráfico 1 apresenta o tempo de morte dos compostos PJ 5, PJ 21 e 14c contra *M. tuberculosis*.

Pode-se observar que o PJ 21 destaca-se pela sua rápida ação bactericida, eliminando totalmente o inóculo inicial. Já o composto 14c apresentou uma redução do número de UFC.mL^{-1} mais acentuada entre o sétimo e décimo primeiro dia de contato. E por fim, o PJ5 apresentou um perfil semelhante aos antibióticos bacteriostáticos.

Gráfico 1. Curva de morte dos compostos PJ5, PJ21 e 14c de acordo com o tempo.



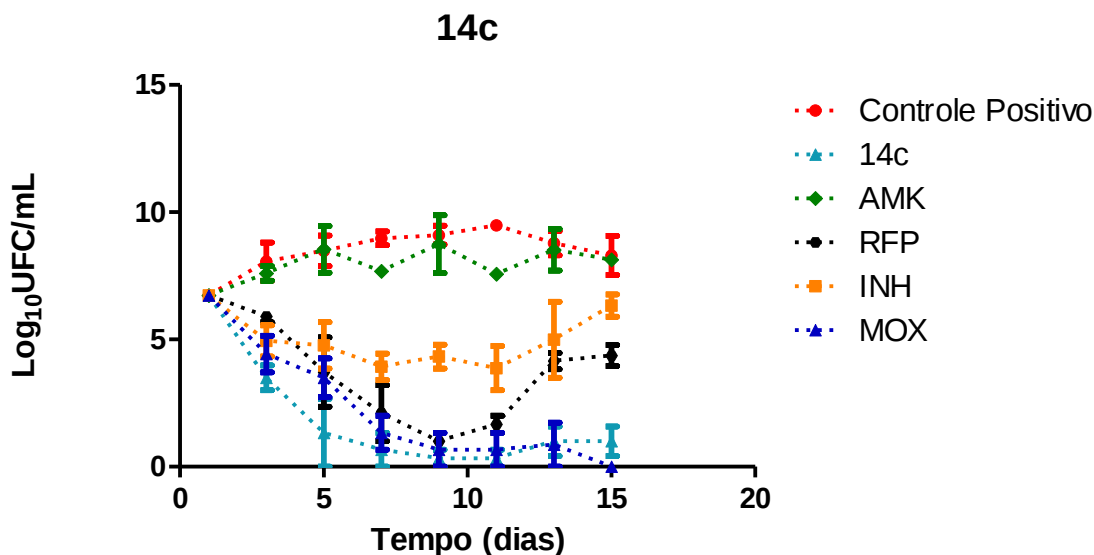
2. Comparação do comportamento cinético dos compostos 14c, PJ5 e PJ21 com antibióticos empregados na terapia anti-TB

Comparando estes compostos inéditos com antibióticos já empregados na terapia conforme os gráficos 2, 3 e 4, pode-se observar que dentro das condições experimentais e das concentrações utilizadas as moléculas benzofuroxânicas e a molécula furoxânica apresentam perfis de morte semelhantes ou superior aos fármacos.

Dentro dos fármacos utilizados neste trabalho, o composto 14c se assemelha mais a MOX que é um antibiótico bactericida da classe das fluoroquinolonas.

O fato da molécula 14c apresentar uma redução do inóculo mais acentuada até o sétimo dia e em seguida uma manutenção de $1 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$, pode sugerir que a molécula não foi degradada e conteve o crescimento bacteriano durante todo o tempo de exposição. Extrapolando para uma aplicação *in vivo* esta ação poderia sugerir um efeito prolongado desta nova molécula antibiótica.

Gráfico 2. Comparação entre a molécula 14c e os fármacos utilizados como controle (AMK, RFP, INH e MOX).

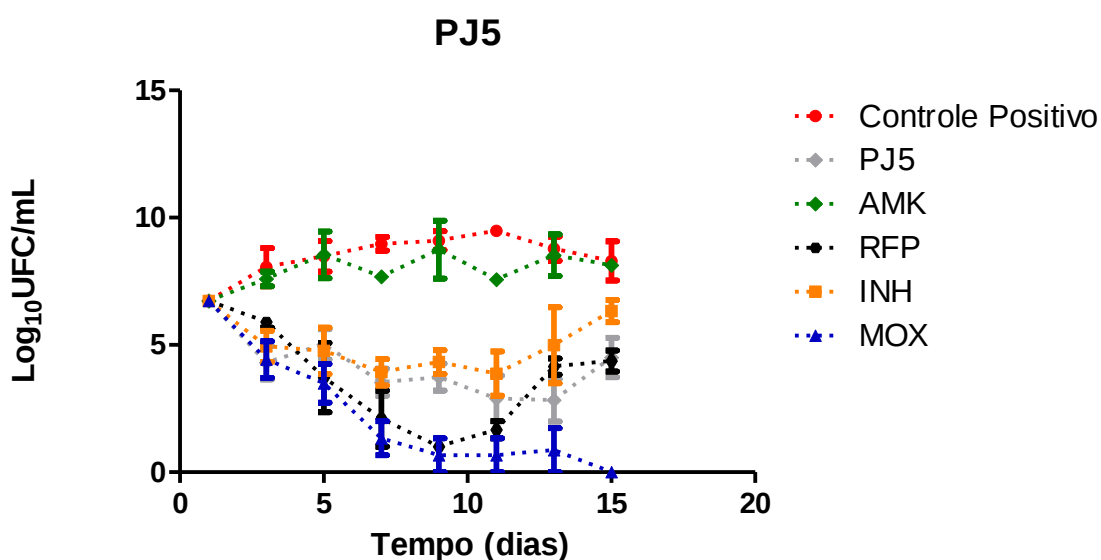


Ngwane e colaboradores, sintetizaram uma série de compostos derivados da 2 (5H)-furanona. O composto que mais se destacou dentro da série foi nomeado de 14. A cinética bactericida deste composto mostrou um efeito bacteriostático em $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, um efeito bactericida a $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e na concentração de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não teve ação contra o crescimento micobacteriano. O efeito bactericida foi considerado como uma redução de aproximadamente $3 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ a partir do inóculo inicial após dez dias de experimento e que se manteve até o vigésimo primeiro dia após o início do experimento, enquanto as moléculas 14c e PJ21 apresentaram efeito bactericida em concentrações menores: $0,96 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $11,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente (BAKKER-WOUDENBERG, et al., 2005).

Já o PJ5 apresentou uma ação bacteriostática, semelhante à INH, dentro das condições experimentais. Fármacos bacteriostáticos tem grande importância na terapia anti-TB, pois embora não tenham a capacidade de eliminar o bacilo, contribuem para aumentar a eficácia do tratamento, visto que sempre o tratamento envolve uma combinação de fármacos, por exemplo, os fármacos etambutol, que atua inibindo a síntese de arabinogalactano da

parede celular (TAKAYAMA, et al., 1989) e D-cicloserina, que interfere na síntese do peptidoglicano da parede celular por ser estruturalmente semelhante ao aminoácido D-alanina (ZHANG, 2005) também são fármacos bacteriostáticos empregados no tratamento de TB.

Gráfico 3. Comparação entre a molécula PJ5 e os fármacos utilizados como controle (AMK, RFP, INH e MOX).

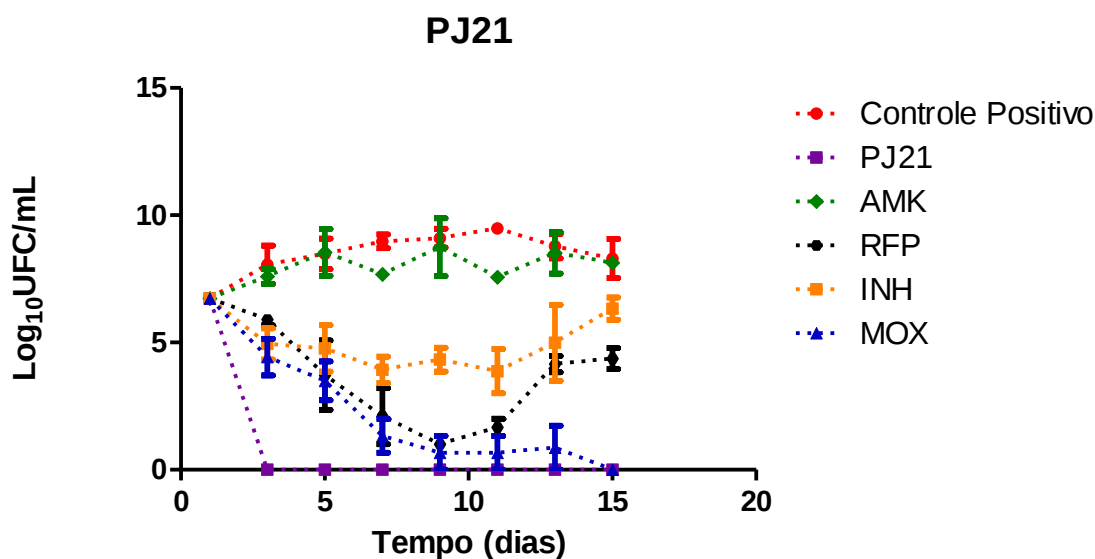


O composto PJ21 apresentou um efeito bactericida e eliminou de $6,73 \pm 0,18$ Log₁₀UFC.mL⁻¹ em 48 horas de contato, mostrando-se superior aos quatro antibióticos utilizados como controles, considerando as concentrações utilizadas.

Em um estudo feito com a BDQ, utilizando as concentrações de 3xCIM, 30xCIM e 300xCIM (CIM = 0.03 mg.mL⁻¹ (ANDRIES, et al., 2005))) a partir de um inóculo inicial de 6 Log₁₀UFC.mL⁻¹ e durante 18 dias, observou-se que com 3xCIM não houve redução do inóculo bacteriano, mas sim um discreto crescimento nos primeiros dias e atingindo o máximo de crescimento no décimo quinto dia de experimento com aproximadamente 8,5 Log₁₀UFC.mL⁻¹. Com a concentração de 30xCIM houve morte bacteriana, com as menores contagens nos últimos quatro dias de experimento com aproximadamente 3,5Log₁₀UFC.mL⁻¹.

Com a concentração de 300xCIM, o inóculo foi reduzido ao limite de detecção do método de $2 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ no décimo quarto dia de experimento (KOUL, et al., 2014).

Gráfico 4. Comparação entre a molécula PJ21 e os fármacos utilizados como controle (AMK, RFP, INH e MOX).



Comparando os resultados obtidos por Koul e colaboradores para a BDQ com o PJ 21 (concentração utilizada = $11,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o efeito bactericida de PJ 21 foi superior eliminando totalmente o inóculo micobacteriano no terceiro dia de experimento.

3. Comportamento cinético da combinação de PJ5 com antibióticos empregados na terapia anti-TB

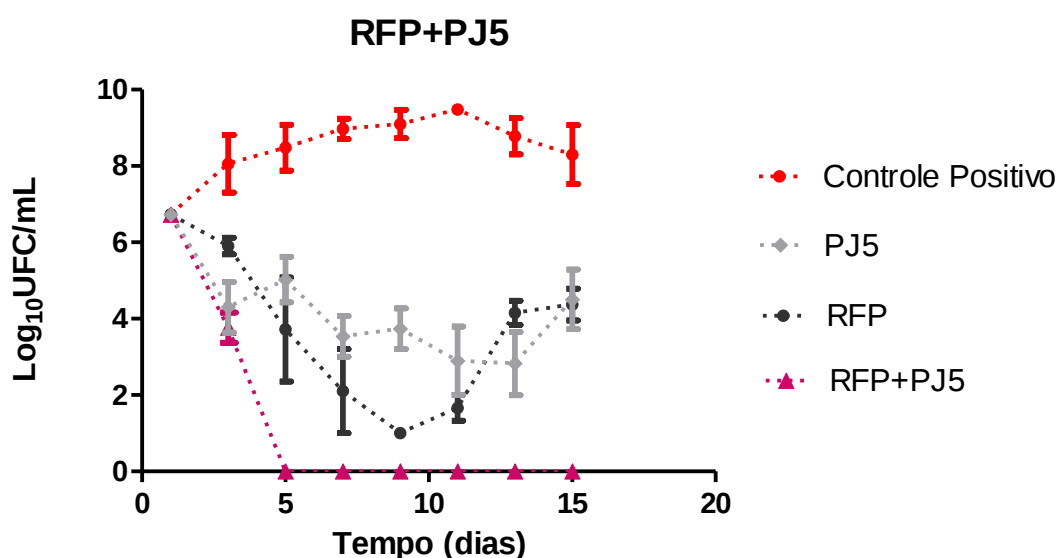
O composto PJ5 é a molécula que apresenta o maior IS, no entanto, em relação aos outros, foi a que demonstrou pior comportamento cinético, diante disso, questionamos se a combinação dele com outros antibióticos poderia potencializar a sua atividade, já que a terapia anti-TB é sempre uma politerapia. O fato de esta molécula ter o maior IS, indicando sua menor toxicidade, e apresentando efeito sinérgico quando combinadas com antibióticos

indica que ela poderia ser incluída a terapia com maior segurança ao paciente. Visto que além de atividade anti-TB, é essencial que novos candidatos a antibióticos sejam seguros.

Os resultados da combinação do PJ5 com os fármacos RFP, INH, AMK e MOX estão nos gráficos 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Segundo a classificação descrita, combinações que apresentarem uma redução de $\text{Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ maior que 2 se comparado com o mais ativo são consideradas sinérgicas.

Gráfico 5. Cinética bactericida de PJ 5 em combinação com RFP.



A RFP após os 14 dias de experimento apresentava $4,37 \pm 0,72 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$, o PJ5 sozinho apresentava $5,26 \pm 0,50 \text{ Log}_{10} \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$, enquanto a combinação PJ5+RFP apresentou efeito bactericida, ou seja, não houve crescimento de colônias, logo esta combinação foi classificada como um efeito sinérgico.

Observa-se que até o sétimo dia de experimento, ocorre um decaimento das contagens de UFC na presença de RFP, e a partir do sétimo dia as contagens de UFC voltam a aumentar, o que poderia ser explicado por um aumento na tolerância do inóculo à presença do fármaco.

Esta tolerância poderia ser explicada pela ação de bombas de efluxo que iriam reduzir a concentração citoplasmática do fármaco (resistência fenotípica) ou pela seleção de mutantes naturalmente resistentes gerados por mutações genéticas espontâneas (resistência genotípica). No trabalho de Steenwinkel e colaboradores, em 2010, após o experimento de cinética de seis dias, amostras foram selecionadas e plaqueadas em meios contendo antibiótico, antibiótico mais inibidor de bombas de efluxo (reserpina), somente a reserpina (em concentração que não inibia o crescimento micobacteriano) e em meio de cultura apenas com o objetivo de analisar o mecanismo de resistência destas amostras. Das colônias que cresceram nos meios contendo antibiótico, avaliou-se a presença de mutações genéticas por meio do kit GenoType MTBDR *plus* e MTBDR *sl* (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany).

Das 10 colônias selecionadas resistentes a RFP, todas apresentaram mutação no gene *rpoB* (seis colônias com mutação His526Tyr e duas colônias com uma mutação desconhecida no mesmo códon, uma colônia com a mutação Ser531Leu e outra colônia com mutação desconhecida no códon 531 ou 533) (STEENWINKEL, et al., 2010).

Já das amostras selecionadas resistentes a INH, nenhuma apresentou mutação nos genes *katG* e *inhA*, mas três das dez colônias selecionadas apresentaram deleções no gene *katG*, concluindo que a subpopulação resistente a ação do fármaco em sua maioria não apresenta mutação nos genes do alvos dos fármacos, sugerindo que se trata de uma resistência fenotípica. Esta sugestão foi confirmada pelo fato que as amostras não cresceram nas placas contendo INH+reserpina, demonstrando que o inibidor de bombas de efluxo foi capaz de reverter a sensibilidade das amostras ao fármaco (STEENWINKEL, et al., 2010).

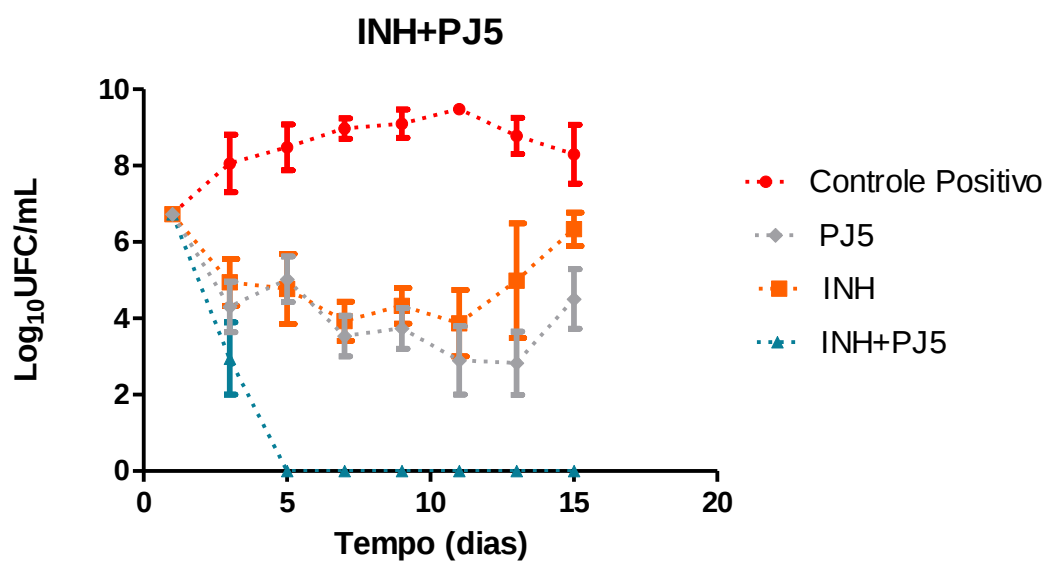
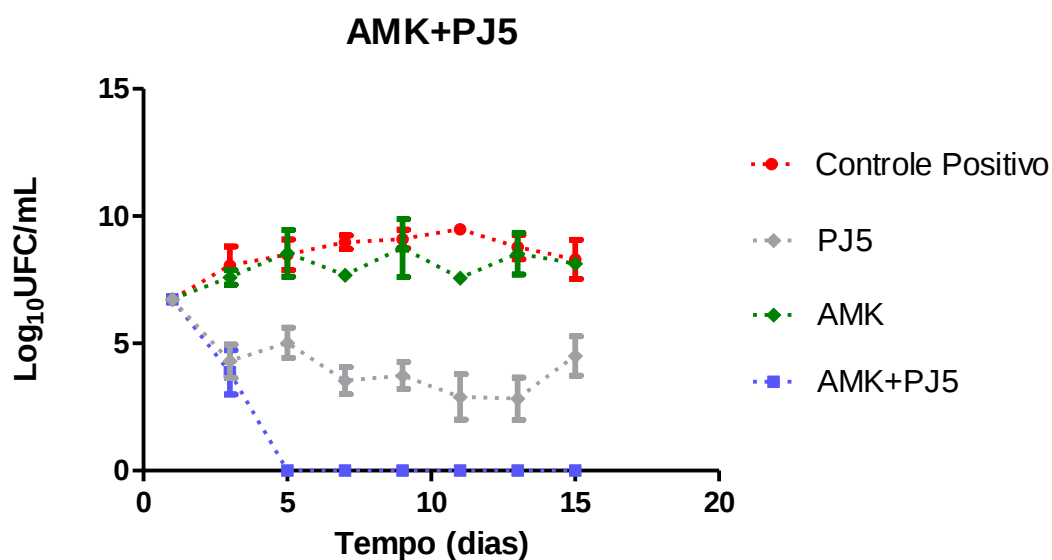
Ainda no trabalho de Steenwinkel e colaboradores, observou-se que com a concentração de 0,0075 mg.L⁻¹ de RFP, semelhante a utilizada neste experimento de 0,008 µg.mL⁻¹ e houve o mesmo decaimento inicial de 5,699 Log₁₀UFC.mL⁻¹ (inóculo inicial) para

aproximadamente $4 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$, sendo que a menor concentração de RFP capaz de eliminar totalmente o inóculo foi de 8 mg.L^{-1} .

A combinação de RFP ($0,0032 \text{ mg.L}^{-1}$) com INH (0.064 mg.L^{-1}), que é empregada no tratamento de TB, em 6 dias de experimento, apresentou uma redução do inóculo inicial de $5,18 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ para aproximadamente $4 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$. Dentro das condições empregadas no estudo, pode-se considerar que a combinação de RFP+INH foi inferior a combinação de RFP+PJ5 (BREDA, et al., 2015).

Um efeito sinérgico foi observado nas combinações de PJ5+INH (Gráfico 6) e PJ5+AMK (Gráfico 7), pois após os 14 dias de experimento, observou-se uma contagem de $6,34 \pm 0,76 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ para INH e de $8,13 \pm 0,76 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ para AMK, enquanto as combinações apresentaram efeito bactericida no quinto dia de experimento. Sendo PJ5 sozinho foi mais ativo que INH e AMK contra o crescimento micobacteriano apresentando uma contagem de $5,26 \pm 0,50 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$, se comparado com a contagem, depois de 14 dias de experimento, de INH e AMK.

A INH é um fármaco cuja ação é dose-dependente e apresenta efeito bacteriostático (STEENWINKEL, et al., 2010). Além do efeito bacteriostático deste antibiótico, pode-se sugerir que ao final de 14 dias de exposição à INH, as micobactérias restantes sejam mais tolerantes a INH, devido à ação de bombas de efluxo ou devido a alterações genéticas que resultem em contagens de UFC próximas as do início do experimento, como mencionado anteriormente no trabalho de STEENWINKEL e colaboradores.

Gráfico 6. Cinética bactericida de PJ 5 em combinação com INH.**Gráfico 7.** Cinética bactericida de PJ 5 em combinação com AMK.

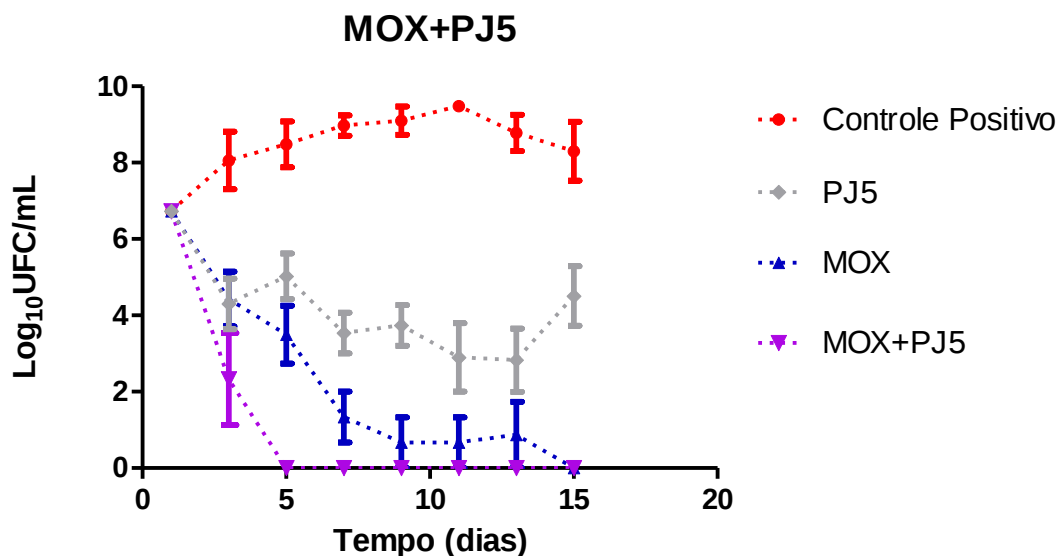
Embora AMK sozinha não foi capaz de reduzir o inóculo micobacteriano, sua combinação com PJ5 foi capaz de eliminar o inóculo dentro de 48h de exposição.

AMK, dentro das condições experimentais utilizadas, não apresentou inibição do crescimento micobacteriano, provavelmente, a concentração de fármaco utilizada ($0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi inferior a necessária para tal inibição, visto que a ação deste antibiótico é dose-dependente (STEENWINKEL, et al., 2010). Além disso, como a concentração tomada por base foi de duas vezes o valor da CIM determinada pelo método do REMA, deve-se destacar que as condições experimentais são distintas, já que no método do REMA utilizam-se microplacas de 96 poços e o volume de cada poço é de $200 \mu\text{L}$ e é um ensaio estático, enquanto o ensaio de curva de morte utiliza o volume de 50 mL de inóculo bacteriano em *erlenmeyer* e é feito sob agitação, de forma a favorecer a oxigenação do meio e, consequentemente, a multiplicação bacteriana.

Segundo Steenwinkel e colaboradores, com a concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AMK, houve crescimento bacteriano de $5,699 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ (inóculo inicial) para aproximadamente $8 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$, em seis dias de exposição, mas com a concentração de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ já pode-se observar redução do inóculo bacteriano para $4 \text{ Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ no mesmo intervalo de tempo. A concentração de AMK necessária para a eliminação de 100% do inóculo, após seis dias de exposição, foi de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Já a combinação de MOX+PJ5 apresentou um efeito indiferente, pois nas concentrações testadas e dentro deste intervalo de experimento, tanto MOX sozinho quanto MOX combinado com PJ5 apresentaram efeito bactericida. Apesar de em 15 dias o resultado obtido seja um efeito indiferente, pode-se observar no gráfico que a combinação MOX+PJ5 em apenas cinco dias foi capaz de eliminar totalmente o inóculo micobacteriano, enquanto MOX sozinha, só apresentou este efeito no décimo quinto dia de experimento, sendo que o decaimento da contagem de UFC foi mais acentuado entre o primeiro e o sétimo dia do experimento.

Gráfico 8. Cinética bactericida de PJ 5 em combinação com MOX.



Este efeito é chamado de atividade bactericida precoce, ou seja, o antibiótico reduz a carga bacteriana nos primeiros dias de contato ou tratamento, além disso, pode-se observar que quando combinados PJ5+MOX apresentaram a atividade bactericida precoce ainda melhor, reduzindo a carga bacteriana em um intervalo de tempo menor. MOX é a fluoroquinolonas mais ativa contra *M. tuberculosis in vitro* e sua atividade bactericida precoce já foi relatada por Pletz e colaboradores em que MOX reduziu em 0.273 Log₁₀UCF.mL⁻¹ por mL de escarro por dia, no intervalo de cinco dias da contagem de UFC em pacientes com TB (DIACON E DONALD, 2014).

Conclusão

A partir da cinética bactericida dos compostos benzofuroxânicos e furoxânico pode-se comprovar seu potencial anti-TB, seja com atividade bactericida, para 14c e para PJ21, ou com atividade bacteriostática para PJ5.

Com este estudo, podemos afirmar que o PJ5 pode ser utilizado na poliquimioterapia de TB já que apresenta uma interação positiva com quatro dos principais

antibióticos empregados no tratamento e, além disso, como observou-se um efeito sinérgico nas combinações de PJ5 com RFP, INH e AMK, podendo, então, concluir que o PJ5 é capaz de potencializar efeito destes antibióticos, mostrando-se um composto altamente promissor.

Pode-se ainda inferir que resultados semelhantes podem ser obtidos com a combinação de outros compostos furoxânicos ou benzofuroxânicos, já que são moléculas pertencentes à mesma classe química e apresentam com excelente atividade contra o bacilo e alto índice de seletividade.

Referências Bibliográficas

- ALANGADEN, G. J.; KREISWIRTH, B. N.; AOUAD, A.; KHETARPAL, M.; IGNO, F. R.; MOGHAZEH, S. L.; MANAVATHU, E. K.; LERNER, S. A. Mechanism of Resistance to Amikacin and Kanamycin in *Mycobacterium*. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, vol. 42, n. 5, pp. 1295-1297, 1998.
- ANDRIES, K.; VERHASSELT, P.; GUILLEMONT, J.; GÖHLMANN, H. W.; NEEFS, J. M.; WINKLER, H.; VAN GESTEL, J.; TIMMERMAN, P.; ZHU, M.; LEE, E.; WILLIAMS, P.; DE CHAFFOY, D.; HUITRIC, E.; HOFFNER, S.; CAMBAU, E.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LOUNIS, N.; JARLIER, V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium Tuberculosis*. ***Science***, p. 223–227, 2005.
- BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M.; VIANEN, W. V.; SOOLINGEN, D. V.; VERBRUGH, H. A.; AGTMAEL, M. A. V. Antimycobacterial agents differ with respect to their bacteriostatic versus bactericidal activities in relation to time of exposure, mycobacterial growth phase, and their use in combination. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, vol. 49, n. 6, p. 2387–2398, 2005.
- BHUSAL, Y.; SHIOHIRA, C. M.; YAMANE, N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. ***Int J Antimicrob Agents***, vol. 26, n. 4, pp. 292-297, 2005.
- BREDA, S. V.; BUYS, A.; APOSTOLIDES, Z.; NARDELL, E. A.; STOLTZ, A. C. The antimicrobial effect of colistin methanesulfonate on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. ***Tuberculosis***, vol. 95, pp. 440-446, 2015.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, pp. 57-71, 2005.

COHEN, K. A.; BISHAI, W. R.; PYM, A. S. Molecular Basis of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology Spectrum*, vol. 2, pp. 1-16, 2014.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY III, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; R. CONNOR, R. DAVIES, K. DEVLIN; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from complete genome sequence. *Nature*, vol. 393, pp. 537-564, 1998.

DIACON, A. H.; DONALD, P. R. The early bactericidal activity of antituberculosis drugs. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 12(2), 223–237, 2014.

DUTRA, L. A.; ALMEIDA, L. D.; PASSALACQUA, T. G.; REIS, J. S.; TORRES, F. A. E.; MARTINEZ, I.; PECCININI, R. G.; CHIN, C. M.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R.; GRAMINHA, M. A. S.; SANTOS, J. L. Leishmanicidal Activities of Novel Synthetic Furoxan and Benzofuroxan Derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 58, n. 8, p. 4837–4847, 2014.

FERNANDES, G. F. S. **Planejamento, síntese e avaliação anti-*Mycobacterium tuberculosis* de novos derivados N-óxidos**. 2016a. 2v.(i, 196; ii, 142 p.). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016a.

FERNANDES, G. F. S.; SOUZA, P. C.; MARINO, L. B.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; LAZZARATO, L.; FRUTTERO, R.; CHIN, C. M.; PAVAN, F. R.; SANTOS, J. L. Synthesis and biological activity of furoxan derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 1-35, 2016b.

GASCO, A.; FRUTTERO, R.; SORBA, G.; STILO, A. D.; CALVINO, R. NO donors: focus on furoxan derivatives. ***Pure and Applied Chemistry***, p. 973–981, 2004.

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R.; SAUVAIN, M.; LIMA, L.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, vol. 59, pp. 64-74, 2013.

JNAWALI, H. N.; YOO, H.; RYOO, S.; LEE, K. J.; KIM, B. J.; KOH, W. J.; KIM, C. K.; KIM, H. J.; PARK, Y. K. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, vol. 29, pp. 957-982, 2013.

K. ANDRIES, P. VERHASSELT, J. GUILLEMONT, H. W. H. GÖHLMANN, J.-M. NEEFS, H. WINKLER, J. V. GESTEL, P. TIMMERMAN, M. ZHU, E. LEE, P. WILLIAMS, D. D. CHAFFOY, E. HUITRIC, S. HOFFNER, E. CAMBAU E C. TRUFF. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. ***Science***, vol. 307, pp. 223-227, 2005.

KELLEY, C. L.; ROUSE, D. A.; MORRIS, A. S. L. Analysis of *ahpC* Gene Mutations in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. ***Antimicrobial agents and chemotherapy***, vol. 41, n. 9, pp. 2057-2058, September 1997.

KOUL, A.; VRANCKX, L.; DHAR, N.; GOHLMANN, H. W.; OZDEMIR, E.; NEEFS, J.M.; SCHULZ, M.; LU, P.; MORTZ, E.; MCKINNEY, J. D. ; ANDRIES K. ; BALD, D. Delayed bactericidal response of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline involves remodelling of bacterial metabolism. ***Nature communications***, vol. 5, pp. 1-10, 2014.

LEIBERT, E.; DANCKERS, M.; ROM, W. N. New drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis: the case for bedaquiline. ***Therapeutics and Clinical Risk Management***, pp. 597-602, 2014.

LI, J.; GAO, X.; LUO, T.; WU, J.; SUN, G.; LIU, Q.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.; MEI, J.; GAO, Q. Association of *gyrA/B* mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. ***Emerging Microbes and Infections***, vol. 3, n. 9, pp. 1-5, 2014.

LUNA-HERRERA, J.; REDDY, M. V.; GANGADHARAM, P. R. In vitro activity of the benzoxazinorifamycin KRM-1648 against drug-susceptible and multidrug-resistant tubercle bacilli. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, pp. 440-444, 1995.

MACINGWANA, L.; BAKER, B.; NGWANE, A. H.; HARPER, C.; COTTON, M. F.; HESSELING, A.; DIACON, A. H.; HELDEN, P.; WIID, I. Sulfamethoxazole enhances the antimycobacterial activity of rifampicin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n. 97, pp. 2908-2911, 2012.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, G.; QUÉMARD, A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology*, vol. 146, n. 2, pp. 289-296, February 2000.

Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde). **Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública.** 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil.** 2011.

MITCHISON, D. A. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest*, vol. 9, n. 76, pp. 771-781, 1979.

NGWANE, A. H.; PANAYIDES, J.L.; CHOUTEAU, F.; MACINGWANA, L.; VILJOEN, L.; BAKER, B.; MADIKANE, E.; KOCK, C. D.; WIESNER, L.; CHIBALE, K.; PARKINSON, C. J.; MMUTLANE, E. M.; HELDEN, P. V.; WIID, I. Design, Synthesis, and In Vitro Antituberculosis Activity of 2(5H)-Furanone Derivatives. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 68, n. 8, p. 612–620, 2016.

OKAMOTO, S.; TAMARU, A.; NAKAJIMA, C.; NISHIMURA, K.; TANAKA, Y.; TOKUYAMA, S.; SUZUKI, Y. K. OCHI, Y. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, vol. 63, p. 1096–1106, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis report.** 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): Global report on surveillance and response.** 2010.

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

PALOMINO, J. C.; ANANDI, M.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 2720–2722, 2002.

- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antibiotics**, vol. 3, pp. 317-340, 2014.
- PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. D. S.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 45, n. 5, pp. 1898-1905, 2010.
- PETRELLA, S.; CAMBAU, E.; CHAUFFOUR, A.; ANDRIES, K.; JARLIER, V.; SOUGAKOFF, W. Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in Mycobacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, p. 2853–2856, 2006.
- PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial combinations. **Antibiotics in laboratory medicine**, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p. 365–441.
- PLETZ, M. W. R.; DE ROUX, A.; ROTH, A.; NEUMANN, K. H.; H. MAUCH, H.; LODE, H. Early Bactericidal Activity of Moxifloxacin in Treatment of Pulmonary Tuberculosis: a Prospective, Randomized Study. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, p. 780–782, 2004.
- SEIFERT, M.; CATANZARO, D.; CATANZARO, A.; RODWELL, T. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. **PLoS ONE**, vol. 10, n. 3, pp. 1-13, March 2015.
- SERAFIM, R. M.; GONÇALVES, J.; SOUZA, F. D.; LOUREIRO, A. D. M.; STORPIRTIS, S.; KROGH, R.; ANDRICOPULO, A. D.; DIAS, L. C.; FERREIRA, E. I. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazones and furoxan groups with potential and selective anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 82, pp. 418-425, 2014.
- SHERMAN, D. R.; MDLULI, K.; HICKEY, M. J. ; BARRY, C. E.; STOVER, C. K. AhpC, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **BioFactors**, vol. 10, pp. 211-217, 1999.
- SHERMAN, D. R.; MDLULI, K.; HICKEY, M. J.; ARAIN, T. M.; MORRIS, S. L.; Barry III, C. E.; STOVER, C. K. Compensatory *ahpC* Gene Expression in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, vol. 272, pp. 1641-1643, June 1996.

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

TAKAYAMA, K.; KILBURN, J. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, vol. 33, p. 1493–1499, 1989.

TAKIFF, H. E.; SALAZAR, L.; GUERRERO, C.; PHILIPP, W.; HUANG, W. M.; KREISWIRTH, B.; COLE, S. T.; JACOBS-JR, W. R.; TELENTI, A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, vol. 38, n. 4, pp. 773-780, 1994.

TELENTI, A.; IBODEN, P.; MARCHESI, F.; LOWRIE, D.; COLE, S.; COLSTON, M. J.; MATTER, L.; SCHOPFER, K.; BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. ***The Lancet***, vol. 341, pp. 647-652, March 1993.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**, 10^a ed., Benjamin Cummings, 2010.

VELAYAT, A. A.; MASJEDI, M. R.; FARNIA, P.; TABARSI, P.; GHANAVI, J.; HOFFNER, A. H. Z. Z.; SVEN, E. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant tubercullosis bacilli. ***Chest Journal***, vol. 136, n. 2, pp. 420-425, August 2009.

VOSKUIL, M. I.; SCHNAPPINGER, D.; VISCONTI, K. C.; HARRELL, M. I.; DOLGANOV, G. M.; SHERMAN, D. R.; SCHOOLNIK, G. K. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. ***The Journal of Experimental Medicine***, vol. 198, n. 5, p. 705–713, 2003 .

WILLIAMS, D. L.; SPRING, L.; COLLINS, L.; MILLER, L. P.; HEIFETS, L. B.; GANGADHARAM, P. R. J.; GILLIS, T. P. Contribution of *rpoB* Mutations to Development of Rifamycin Cross-Resistance in *Mycobacterium*. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, vol. 42, n. 7, pp. 1853-1857, June 1998.

Y. ZHANG. The magic bullets and tuberculosis drug targets. ***Annual Review of Pharmacology and Toxicology*** , vol. 45, p. 529–564, 2005.

YAMADA, T.; NAGATA, A.; ONO, Y.; SUZUKI, Y.; YAMANOUCHI, A. T. Alteration of Ribosomes and RNA Polymerase in Drug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. ***Antimicrobial agents and Chemotherapy***, vol. 27, n. 6, pp. 921-924, June 1985.

ZAUNBRECHER, M. A.; SIKES, R. D.; METCHOCK, B.; SHINNICK, T. M.; POSEY, J. E. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. ***Proceeding of the National American on Sciences***, vol. 106, pp. 20004-20009, 2009.

Araraquara, 15 de janeiro de 2017.

Camila Maríngolo Ribeiro

De acordo,

Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan