



Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (CAPES 7)

GIULIA POLINÁRIO

**Seleção e estudo biológico de compostos de uma biblioteca de
produtos naturais frente ao *Mycobacterium tuberculosis***

Araraquara

2021

GIULIA POLINÁRIO

Seleção e estudo biológico de compostos de uma biblioteca de produtos naturais frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan.

Araraquara

2021

P768s Polinário, Giulia.
Seleção e estudo biológico de compostos de uma biblioteca de produtos naturais frente ao *Mycobacterium tuberculosis* / Giulia Polinário.
– Araraquara: [S.n.], 2021.
52 f. : il.

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

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Produtos naturais. 3. Atividade anti-tuberculose. 4. Tanshinona I. 5. Tanshinona IIA. 6. Criptotanshinona. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Título.

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

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Seleção e estudo biológico de compostos de uma biblioteca de produtos naturais frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

AUTORA: GIULIA POLINÁRIO

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

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

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

Dr. HAROLDO CESAR DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Carlos Chagas

Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 21 de julho de 2021

GIULIA POLINÁRIO

Seleção e estudo biológico de compostos de uma biblioteca de produtos naturais frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan.

Comissão examinadora

Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan
UNESP – Campus de Araraquara
Orientador

Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos
UNESP – Instituto de Química

Prof. Dr. Haroldo César de Oliveira
Fiocruz - Instituto Carlos Chagas

Araraquara

2021

Dedico este trabalho à minha família, por sempre ser o alicerce para o meu crescimento pessoal e profissional, e por me permitir o privilégio da dedicação exclusiva aos estudos, tornando possível essa carreira. Somos mestres!

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e minha mãe pelas cobranças de antes e o apoio e incentivo de hoje, foi fundamental para chegar até aqui. Obrigada pelas oportunidades que me proporcionaram.

À minha irmã pela parceria e cuidado de irmã mais velha, sendo mais nova. Obrigada por ir além do sentido literal da palavra e ser irmã de coração, além do sangue.

Ao meu irmão por me permitir sentir pela primeira vez o amor de mãe. Ajudar no seu crescimento foi minha primeira experiência para aprender a didática que precisarei agora.

À minha esposa por me dar o privilégio de continuar tendo as oportunidades que sempre tive e ainda me ajudar diretamente no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por ser tão companheira e por ser a pessoa que eu sempre quis ter ao meu lado.

À minha família que se faz presente com todo o amor, carinho e motivação. Vocês são o que eu mais valorizo na vida e é um privilégio ter todos vocês ao meu lado todos os dias.

Aos meus amigos do laboratório por todos os ensinamentos, paciência e parceria. Foi um prazer dividir o ambiente de trabalho com vocês e espero continuar encontrando pessoas maravilhosas assim durante a minha jornada.

Ao meu orientador por não hesitar em me dar a oportunidade e pelo crescimento que me proporcionou durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por ontem e também por amanhã!

Aos membros da banca examinadora, tanto do exame de qualificação quanto desta dissertação, por sua disposição em analisar e contribuir para a finalização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas que já é minha segunda casa há mais de 7 anos e à toda equipe de funcionários que sempre me acolheu tão bem.

À CAPES pela bolsa concedida para a execução desse trabalho, e pelo apoio essencial oferecido nessa época de pandemia.

Agradeço por fim à todas as oportunidades que tive, à todas as pessoas que conheci e pela vida que me é dada diariamente, com novas oportunidades de fazer escolhas que me fazem feliz durante toda a caminhada.

RESUMO

A tuberculose (TB) tem como principal agente etiológico a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a doença causada por um único agente infeccioso que mais mata no mundo, atingindo cerca de um quarto da população mundial na forma latente, representando ainda, um grande problema de saúde pública, devido principalmente ao alto índice de resistência aos antibióticos. O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de Tanshinona I (TI), Tanshinona IIA (TIIA) e Criptotanshinona (CPT) frente ao *M. tuberculosis*, e avaliar sua segurança *in vitro* e *in vivo*. Partindo de uma biblioteca de produtos naturais, nós encontramos TI, TIIA e CPT sendo os compostos mais promissores. Eles foram submetidos ao experimento inicial de concentração inibitória mínima (CIM₉₀) e índice de citotoxicidade (IC₅₀) para analisarmos os seus respectivos índices de seletividade (IS). Em seguida, foram testados também contra modelos gram positivos, gram negativos e leveduras, além de outras micobactérias. Foi determinado também o índice de concentração inibitória fracionada (FICI) quando combinados com rifampicina, um fármaco de primeira linha. Por fim, os compostos foram testados em modelo larval *Galleria mellonella*, a respeito de sua toxicidade aguda. A CIM₉₀ dos compostos foi de 1,03; 0,38 e 1,21 µg/mL para TI, TIIA e CPT, respectivamente, com baixa citotoxicidade e alto IS. Os resultados frente isolados clínicos resistentes foram bastante satisfatórios, com as 3 tanshinonas apresentando CIM₉₀ menor que 3 µg/mL em pelo menos 5 dos 9 testados. O espectro de atividade dos compostos foi classificado como estreito em virtude da não atividade nos modelos de bactérias gram positiva e gram negativa, bem como de outros gêneros de micobactéria utilizados. Ainda, apresentaram CIM₉₀ em torno de 0,30 µg/mL frente *M. bovis*, que possui 99,55% de similaridade estrutural com *M. tuberculosis*. Como resultado do FICI foi apresentado sinergismo para TI e neutralidade para TIIA e CPT. A toxicidade *in vivo* frente *Galleria mellonella* com uma concentração de 2.000 mg/kg de peso corpóreo não resultou em nenhuma morte em 120h de observação. Em conclusão, apresentamos resultados de 3 compostos naturais amplamente estudados, mas que se mostram promissores na busca de alternativas a terapias da tuberculose.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, produtos naturais, atividade anti-tuberculose, Tanshinona I, Tanshinona IIA, Criptotanshinona.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) has as its main etiological agent the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* and, according to the World Health Organization (WHO), it is the disease caused by a single infectious agent that kills the most in the world, affecting about a quarter of the world population in its latent form, representing still, a major public health problem, mainly due to the high rate of antibiotic resistance. This work aims to evaluate the potential of Tanshinone I (TI), Tanshinone IIA (TIIA) and Cryptotanshinone (CPT) against *M. tuberculosis*, and assess the safety *in vitro* and *in vivo*. From a library of natural compounds, we find the most promising compounds being TI, TIIA and CPT. They were subjected to initial experiments of minimal inhibitory concentrations (MIC₉₀) and cytotoxicity index (IC₅₀) to analyze your selectivity index (SI). Then, were tested against gram-positive, gram-negative and yeast models, besides other mycobacteria. Was also analyzed the fractional inhibitory concentration index (FICI) when combined with rifampicin, a first-line drug. And finally, the compounds were tested for their acute toxicity against *Galleria mellonella* larval model. The MIC₉₀ of the compounds was 1.03; 0.38 and 1.21 µg/mL, for TI, TIIA and CPT, respectively, with very low cytotoxicity and high SI. The results against resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* were quite satisfactory, with the 3 tanshinones showing MIC₉₀ smaller than 3 µg/mL in at least 5 of 9 tested. The activity spectrum of compounds was classified as narrow due to non-activity in gram-negative and gram-positive bacterial models, as well as another genus of mycobacteria used. Still, showed MIC₉₀ around 0.3 µg/mL against *M. bovis*, that have 99.55% of structural similarity with *M. tuberculosis*. As a result of FICI, was presented synergism for TI and neutrality for TIIA and CPT. The *in vivo* toxicity against *Galleria mellonella* with a concentration of 2,000 mg/kg of body weight, did not show any death within 120 hours of observation. In conclusion, we present results of 3 natural compounds widely studied, but that show promise in the search for alternatives to tuberculosis therapies.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, natural products, anti-tuberculosis activity, Tanshinone I, Tanshinone IIA, Cryptotanshinone.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AMK	Amicacina
ATCC	American type culture collection
CF	Clemente Ferreira
CFU/mL	Colony-forming unities per mL
CIM ₉₀	Concentração inibitória mínima para 90%
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
CPT	Criptotanshinona
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COVID-19	Coronavírus Disease 2019
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
EtBr	Ethidium bromide
FDA	Food and drug administration
GDP	Gross Domestic Product
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	Índice de citotoxicidade
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
INH	Isoniazida
IS	Índice de seletividade
MDR-TB	Tuberculose multi-droga resistente
MIC ₉₀	Minimum inhibitory concentration for 90%
MOX	Moxifloxacino
OADC	Suplemento composto por ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
REDCA	Resazurin drugs combination microtiter assay
REMA	Resazurin microtiter assay
RFP	Rifampicina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RR-TB	Tuberculose resistente à rifampicina
SFB	Soro fetal bovino
SI	Selectivity index
STS	Sulfonato de sódio Tanshinona IIA
TI	Tanshinona I
TIIA	Tanshinona IIA
TB	Tuberculose
TCM	Traditional chinese medicine
TDR-TB	Tuberculose totalmente resistente
UFC	Unidades formadoras de colônia
WHO	Organização mundial de saúde (Word Health Organization)
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1. Países que tiveram pelo menos 100 mil casos incidentes de TB em 2019. 14
- Figura 2. Esquema básico de tratamento da tuberculose sensível em adultos e adolescentes. 16
- Figura 3. Porcentagem de casos de TB confirmados bacteriologicamente testados para RR-TB em 2019. Os dados são apenas para TB pulmonar e abrangem os casos novos e já tratados. . 17
- Figura 4. Previsão do número de mortes por TB em 2020 se houver redução de 50% na detecção dos casos durante 3 meses. 19
- Figura 5. *Salvia milthiorriza* (Danshen) com destaque para a raiz, de onde são extraídas as tanshinonas. 21
- Figura 6. Estrutura química e massa molecular das tanshinonas estudadas neste trabalho..... 22
- Figura 7. Estrutura química da Tanshinona IIA (A) e seu derivado solúvel Sulfonato de Sódio Tanshinona IIA (B)..... 22

Capítulo II

- Figure 1. Chemical structure and molecular mass of Tanshinone I, Tanshinone IIA and Cryptotanshinone..... 40
- Figure 2. *Galleria mellonella* larvae. 46

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Table 1. Results of the Minimum inhibitory concentration (MIC ₉₀) of the 76 compounds from the commercial library of natural compounds submitted to the screening, in µg/ml.	38
Table 2. Results of MIC ₉₀ and IC ₅₀ of the compounds, followed by their respective SI (µM).	39
Table 3. Result of the average of 3 independent replicates of the MIC ₉₀ assay performed according to the CLSI manual, with the species <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775), <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 13388), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) and <i>Candida albicans</i> (ATCC 90028).	41
Table 4. MIC ₉₀ of tanshinones against <i>M. smegmatis</i> and <i>M. bovis</i>	41
Table 5. MIC ₉₀ results of compounds and standard drugs against resistant clinical isolates. *In bold MICs considered resistant to control drugs according to HEYSELL et al., 2015.	42
Table 6. Minimum values for determination of phenotypic resistance against clinical strains of <i>M. tuberculosis</i>	43
Table 7. Results of the determination of fractional inhibitory concentration index (FICI).....	45

Sumário

Capítulo I.....	11
1. Introdução.....	13
1.1 A tuberculose	13
1.2 Patogênese e transmissibilidade.....	14
1.3 Tratamento	15
1.4 Resistência	17
1.5 O impacto da pandemia de COVID-19 na Estratégia End TB	18
1.6 As tanshinonas de Danshen	20
1.6.1 A atividade antimicrobiana das tanshinonas	23
2. Justificativa.....	23
3. Objetivos.....	24
2.1 Objetivos específicos	24
4. Referências bibliográficas.....	26
 Capítulo II.....	 30
1. Introduction	33
2. Material and methods.....	35
2.1 Selection of compounds.....	35
2.2 Bacterial strains.....	35
2.3 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC ₉₀) in aerobiosis	35
2.4 Cytotoxicity assay (IC ₅₀)	36
2.5 Determination of the Selectivity Index (SI).....	36
2.6 Determination of the spectrum of action	36
2.7 Evaluation of the activity of compounds against other mycobacteria	37
2.8 Determination of fractional inhibitory concentration index (FICI)	37
2.9 Assessment of acute toxicity in <i>Galleria mellonella</i>	37
3. Results and Discussion.....	37
4. Conclusion	47
5. References.....	48

Capítulo I

1. Introdução

1.1 A tuberculose

Lesões ósseas compatíveis com a tuberculose (TB) foram encontradas em esqueletos que viveram em cerca de 5.000 A.C., mas a primeira evidência mais segura da doença foram em múmias bem preservadas de faraós que viveram entre os anos 3.700 a 1.000 A.C em Tebas, sendo a maioria da 21ª dinastia do Egito. O primeiro diagnóstico bacteriológico com técnicas de biologia molecular foi realizado no corpo de uma jovem inca plebeia, que teve o corpo mumificado espontaneamente pelas condições peculiares do terreno. Segundo a datação, ela viveu no Peru na época de 1.100 A.C. No Brasil, a doença chegou aos índios na primeira fase da colonização, através dos jesuítas e colonos que foram atraídos pelos ‘benefícios do clima ameno’. Os doentes eram chamados de ‘tísicos’, mas em 1839 Schoenlein criou o termo ‘tuberculose’, derivado de ‘tubérculo’, o nome dado ao nódulo lesional por Sylvius Deleboe, em 1680 (Rosemberg, 1999).

Apesar de antiga, continua sendo um grande problema de saúde em nível global, adoecendo cerca de 10 milhões de pessoas por ano nos últimos anos (World Health Organization, 2019). A identificação do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* sendo o principal agente etiológico responsável pela tuberculose foi descoberta por Robert Koch em 1882, porém antes disso, já haviam estudos demonstrando a patogênese e a transmissibilidade da doença. Na sequência, em 1890, Koch isolou dos bacilos de *M. tuberculosis* uma substância que ele chamou de tuberculina, e acreditou que seria a cura para a doença. Quando anunciada, mesmo com seu preço altíssimo, as passagens nos trens da Europa esgotaram-se por vários meses, tamanha era a procura pelo tratamento, mas não demorou para tudo desmoronar novamente. As doses de tuberculina levaram à rápida progressão da doença com reações sistêmicas graves, resultando rapidamente em morte. A substância foi abandonada, até que um pouco depois, em 1909, o pediatra Clemens Freiherr von Pirquet, descobriu que na verdade era uma substância que poderia ajudar no diagnóstico principalmente de crianças com infecção latente, sendo hoje uma das armas mais importantes para o estudo epidemiológico da tuberculose (Daniel, 2006; Rosemberg, 1999).

M. tuberculosis é um bacilo aeróbico de crescimento lento, com um tempo de divisão de cerca de 24 horas. Assim como outras micobactérias, pode ser visualizado através da coloração de *Ziehl-Neelsen*, pois sua parede celular espessa e cerosa retém a coloração de carbolfucsina frente a lavagens com álcool-ácido, mas pode ser diferenciado utilizando testes bioquímicos rápidos ou reação em cadeia da polimerase (PCR). *M. tuberculosis* é um agente

sistema imunológico, ser contido em estado de latência ou dar origem a uma infecção ativa. O resultado difere para cada indivíduo, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. (Ankrah et al., 2018).

A maioria das pessoas infectadas apresentam infecção latente (cerca de 90%), na qual a bactéria pode persistir por décadas em um estado metabolicamente inativo ou de replicação lenta. As estimativas são de que quase 2 bilhões de pessoas estão infectadas de forma latente, fornecendo um reservatório global de infecção. Em aproximadamente 5% dos indivíduos infectados, o sistema imunológico é eficaz no controle dessa infecção inicial, mas as bactérias viáveis permanecem dormentes e reativam posteriormente, essa categoria é conhecida como TB pós-primária ou de reativação; e nos outros 5% dos indivíduos infectados, o sistema imunológico é incapaz de conter a infecção inicial e a TB ativa se desenvolve nos primeiros 1-2 anos, essa categoria é conhecida como TB primária (Gordon e Parish, 2018; Nachiappan *et al.*, 2017).

Os sintomas comuns são tosse com escarro e às vezes com sangue, dores no peito, fraqueza, perda de peso, febre e suores noturnos. Muitas vezes, esses sintomas são leves por muitos meses, levando a atrasos na procura de cuidados e aumentando o risco de espalhar a infecção para outras pessoas (World Health Organization, 2020). A infecção normalmente resulta na formação de granuloma em torno do foco inicial da infecção e pode levar a lesões caseosas e formação de cavidades, sendo nesse último caso extremamente infecciosas, pois é a consequência da destruição do tecido pulmonar com formação de espaços abertos macroscópicos que contém numerosos bacilos e conecta-se com as grandes vias aéreas, o que facilita a expectoração eficiente da bactéria (Younga and Verreck, 2012).

1.3 Tratamento

Por quase 3 milênios a recomendação de tratamento era chamada de “regime higienodietético”, ou seja, apenas repouso e alimentação. Também existiram recomendações questionáveis, como: realizar infusão de repolho, de pó de casca de caranguejo, de pulmão de raposa e de fígado de lobo em vinho tinto; comer crocodilo cozido ou pele de burro; sangrias, purgativos, ventosas, vesicatórios, eméticos, sanguessugas e clisteres; cavalgadas por longas horas finalizando com um bom banho em emulsão de tripas de porcos. E por fim algumas recomendações que Rosemberg chamou de “românticas”, que eram todas a base de rosas vermelhas, seja ingerindo através de infusões em mel, ou até mesmo apenas repousar em um quarto forrado de suas pétalas (Rosemberg, 1999).

Hoje, o tratamento mais simples recomendado a pacientes com TB não resistente, conta com uma terapia combinada durante, no mínimo, 6 meses, sendo 2 deles necessariamente de tratamento intensivo e 4 meses de manutenção (figura 2) (World Health Organization, 2017), por isso, o tratamento da tuberculose deve sempre ser acompanhado desde o diagnóstico até a alta do paciente, para que assim a adesão completa seja garantida e que as chances de sucesso do tratamento sejam maiores.

Figura 2. Esquema básico de tratamento da tuberculose sensível em adultos e adolescentes.

ESQUEMA	FAIXAS DE PESO	UNIDADE/DOSE	DURAÇÃO
RHZE 150/75/400/275 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	2 comprimidos	2 meses (fase intensiva)
	36 a 50 Kg	3 comprimidos	
	51 a 70 Kg	4 comprimidos	
	Acima de 70 Kg	5 comprimidos	
RH 300/150 mg ¹ ou 150/75 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	1 comp 300/150 mg ou 2 comp 150/75 mg	4 meses (fase de manutenção)
	36 a 50 Kg	1 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 3 comp 150/75 mg	
	51 a 70 Kg	2 comp 300/150 mg ou 4 comp 150/75 mg	
	Acima de 70 Kg	2 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 5 comp 150/75 mg	

Fonte: (RATIONAL PHARMACEUTICAL MANAGEMENT PLUS, 2005; WHO, 2003). Adaptado de BRASIL, 2011.

R – Rifampicina; H – isoniazida; Z – Pirazinamina; E – Etambutol.

¹A apresentação 300/150 mg em comprimido deverá ser adotada assim que disponível.

Fonte: Brasil, 2019

Uma das formas de prevenção da tuberculose é através da vacinação de recém-nascidos com a dose única da vacina BCG (bacilo Calmette-Guérin), presente no calendário nacional de vacinação no Brasil, que pode conferir proteção principalmente contra as formas graves de tuberculose infantil (World Health Organization, 2020), porém, a vacina produz estado imunitário protetor contra a tuberculose por apenas 10 a 15 anos. Depois da descoberta do agente etiológico, a busca por uma forma de imunização foi intensa, porém, a imunidade antituberculose não resulta de ação específica direta e precisa contra o bacilo, mas sim, envolve um mecanismo imunitário complexo. A vacina BCG deriva de uma cepa do *Mycobacterium bovis*, que no laboratório do Instituto Pasteur, sofreu mutacionismo, reduzindo sua virulência e mantendo propriedades imunizantes (Rosemberg, 2001). Essa

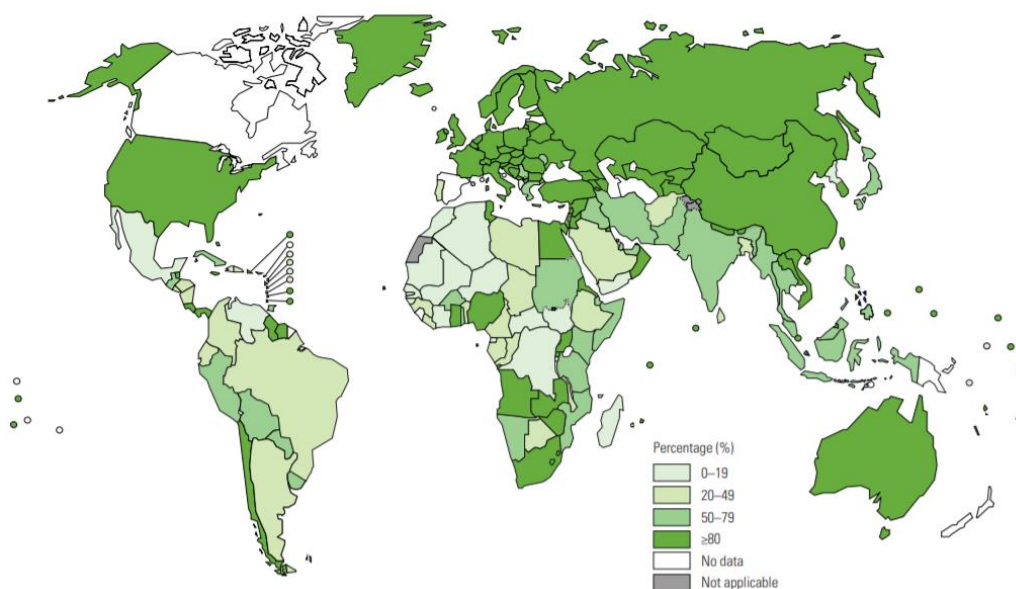
vacina pode causar problemas em pessoas imunocomprometidas, já que a imunização é feita com o bacilo vivo.

1.4 Resistência

O bacilo possui uma parede celular altamente lipofílica e impermeável, o que o torna bem menos acessível e mais resistente aos agentes terapêuticos, porém, além dessa resistência intrínseca, também pode apresentar resistência adquirida e fenotípica, resultando não apenas na limitação do uso dos antibióticos disponíveis, mas também na dificuldade no desenvolvimento de novos medicamentos (Nguyen, 2016).

A TB resistente à rifampicina (RR-TB) é um problema crescente, sendo diagnosticada através do teste de susceptibilidade à droga (TSD) em cerca de 2,2 dos 3,6 milhões (61%) de casos de TB pulmonar notificados globalmente em 2019 (figura 3). Dessas, cerca de 10% também foram diagnosticadas com TB multidroga resistente (MDR-TB), ou seja, eram resistentes à rifampicina e isoniazida, que são os 2 medicamentos mais eficazes para o tratamento de TB. Ainda foi relatado que dentre todos os casos MDR/RR-TB, 71% eram também resistentes à fluoroquinolonas (World Health Organization, 2020).

Figura 3. Porcentagem de casos de TB confirmados bacteriologicamente testados para RR-TB em 2019. Os dados são apenas para TB pulmonar e abrangem os casos novos e já tratados.



Fonte: World Health Organization (2020)

Ainda existem bacilos chamados de extensivamente resistentes (XDR-TB), onde além da resistência frente aos medicamentos de primeira linha citados, ainda apresentam resistência frente a qualquer medicamento do grupo mais potente de medicamentos de segunda linha, o “Grupo A”, que inclui levofloxacina, moxifloxacina, bedaquilina e linezolida. Se a cepa for

resistente à rifampicina, isoniazida e qualquer fluoroquinolona ou a qualquer medicamento de segunda linha, elas são chamadas de pré-XDR-TB (World Health Organization, 2021). A classificação tem o intuito de melhorar o monitoramento e tratamento para esse e todos os outros tipos de resistência.

É importante que esses termos sejam compreendidos, não somente por questões teóricas dessa dissertação, mas também para que sejam ressaltados os fatos de que além de muito mais caro o tratamento com medicamentos de segunda linha, são ainda mais tóxicos, menos efetivos, mais extensos e com maior chance de abandono da terapia.

1.5 O impacto da pandemia de COVID-19 na Estratégia End TB

A Estratégia End TB (pelo fim da tuberculose) foi desenvolvida por todos os estados membros da ONU em 2014, prevendo uma redução de 90% nas mortes e 80% na taxa de incidência de TB até 2030 (World Health Organization, 2016). A estratégia tem como um de seus pilares a intensificação da inovação e da pesquisa como estratégia para uma mudança no enfrentamento da epidemia até 2035 (Barreira, 2018).

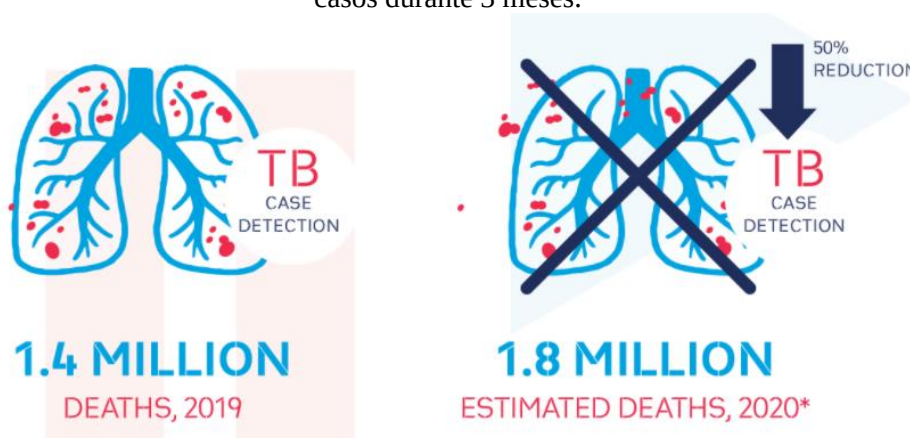
Vários marcos foram definidos para acompanhar o avanço dos esforços que os países estão fazendo para aumentar o número de notificações e diagnóstico, e diminuir a incidência de TB, porém em 2019 uma pneumonia viral extremamente contagiosa causou inúmeras mortes na China e em pouco tempo virou uma pandemia. O patógeno foi identificado e classificado como SARS-CoV-2, o vírus causador da doença coronavírus 2019 (COVID-19) (Huang et al., 2020).

A pandemia de COVID-19 pode prejudicar de maneira significativa o progresso que já foi feito através da estratégia da OMS, pois existem várias semelhanças entre essas duas doenças que podem atrapalhar a distinção no diagnóstico: ambas são transmitidas através de secreções do trato respiratório (Meyerowitz et al., 2021; Wu et al., 2020), atacam principalmente os pulmões e apresentam sintomas semelhantes como tosse, febre e dificuldade para respirar (World Health Organization, 2020).

Segundo o relatório global de 2020, houve uma grande redução no número de casos diagnosticados nos 4 países que respondem por 44% dos casos globais de TB (Índia, Indonésia, Filipinas e África do Sul) (World Health Organization, 2020) e a previsão é de o número de detecção continue caindo, resultando em mais mortes (figura 4). Em uma notícia publicada em março/2021, a OMS afirma que em 2020 o número de pessoas que receberam o tratamento para TB caiu em cerca de 21%, e ainda teme que aproximadamente meio milhão

de pessoas tenham ido a óbito simplesmente por não terem recebido o diagnóstico da doença (Paho, 2021). A OMS ainda arrisca dizer que, devido à pandemia, o número de pessoas que irão desenvolver TB pode aumentar em mais de 1 milhão de pessoas por ano no período de 2020-2025, devido à subnutrição e à queda do PIB per capita. Juntas, as duas doenças mostram sua face mais perversa em populações vulneráveis e com comorbidades (Dara et al., 2020). Além dessas previsões indiretas, alguns países relataram à OMS diversas mudanças que foram feitas que afetam diretamente a Estratégia End TB, como a realocação de serviços humanos e financeiros da TB para a resposta do COVID-19 (World Health Organization, 2020).

Figura 4. Previsão do número de mortes por TB em 2020 se houver redução de 50% na detecção dos casos durante 3 meses.



Fonte: <https://www.who.int/campaigns/world-tb-day/world-tb-day-2021/campaign-materials>

Além da questão que trata a subnotificação e diagnóstico, ainda existe o fato da infecção por *M. tuberculosis* poder ser um fator de risco para casos graves da infecção por COVID-19, já que a tuberculose já é uma doença que acomete principalmente os pulmões, assim como a forma grave da infecção por COVID-19.

Ainda existem poucos estudos para entender quais as possíveis complicações da coinfeção e pouco mais de 1 ano de preocupação mundial com a COVID-19 para poder estimar as consequências que decairão sobre as metas definidas pela ONU, mas um grupo da Romênia analisou o banco de dados eletrônicos do PubMed a fim de estabelecer uma relação e prever os resultados futuros da atual pandemia com os últimos surtos virais e respiratórios. Eles mostraram que a infecção por influenza, por exemplo, pode não só promover a progressão de uma infecção latente de *M. tuberculosis* para uma infecção ativa, como também pode exacerbar a TB pulmonar e modificar sua apresentação clínica (Crisan-Dabija et al.,

2020; Walaza et al., 2020). Analisando os dados de outras epidemias que podem ter alguma relação com COVID-19 ou com TB, o grupo da Romênia concluiu que a coinfeção provavelmente afeta os dois lados: torna mais fácil e rápida a evolução da COVID-19 para casos mais graves e aumenta o risco da reativação da tuberculose (Crisan-Dabija et al., 2020).

Outras publicações recentes também mostram que o impacto do COVID-19 na TB ativa pode ser controlado clinicamente, ou seja, existem casos em que a coinfeção não demonstrou um resultado tão severo (Stochino et al., 2020), e também evidências de que o fato de ter tuberculose não significa uma maior propensão a contrair o COVID-19, mas sim de desenvolver quadros clínicos mais graves (Gao et al., 2021).

1.6 As tanshinonas de Danshen

As tanshinonas estudadas nessa dissertação foram obtidas a partir de uma biblioteca de produtos naturais e selecionadas através de um *screening* para os ensaios iniciais de atividade e citotoxicidade frente ao *M. tuberculosis*. As bibliotecas comerciais são vantajosas principalmente pelo fornecimento de toda a via de síntese das substâncias presentes nelas, facilitando os estudos em animais, por exemplo, que precisam de grande quantidade de massa. A TargetMol® foi a biblioteca utilizada neste trabalho, e nos forneceu informações prévias de estrutura, bioatividade, citotoxicidade, dados de RMN e CLAE para validar a pureza das substâncias.

Os compostos aqui estudados são os 3 principais constituintes lipossolúveis isolados de *Salvia miltiorrhiza* (figura 5) (Xing et al., 2017), uma erva tradicional chinesa com mais de 1000 anos de aplicação clínica para tratar diversas doenças na China (Gao et al., 2018; Gong et al., 2011). Já existem mais de 40 tanshinonas isoladas e identificadas, e as 3 selecionadas neste trabalho já demonstram diversas atividades comprovadas. Li et al (2021) publicaram um artigo de revisão com a base farmacológica de algumas das atividades biológicas, que são no geral: atividade anticâncer; proteção cardiovascular, cerebral, hepática, renal; osteoporose; AVC (acidente vascular cerebral) e efeito neuroprotetor com atividades por exemplo em diabetes e depressão.(Li et al., 2021).

A fraca solubilidade em água faz com que a absorção das tanshinonas seja baixa, fazendo com que somente uma pequena parte continue biodisponível, limitando suas aplicações clínicas, então, novos sistemas de entrega estão sendo desenvolvidos, incluindo lipossomas, dispersão sólida, nanopartículas (NPs) e nanocápsulas lipídicas (LNCs) (Ashour et al., 2020; Cai et al., 2016; Cao et al., 2020), além de outras tentativas de tornar os

compostos clinicamente aplicáveis, como monômeros simples (injeção de Sulfonato de Tanshinona IIA), complexos solúveis em água (Salvionolato e injeção de Danshen), “dripping pills”, comprimidos, cápsulas, entre outros (Ren et al., 2019). Estudos já indicaram efeitos terapêuticos significativos em várias doenças *in vivo* e *in vitro* com múltiplas vias de sinalização, incluindo antiproliferativa, antiapoptótica, antiinflamatória e antioxidativa (Shang et al., 2012). Sulfonato de sódio Tanshinona IIA (STS) é um derivado mais solúvel em água e, conseqüentemente, mais facilmente distribuído (Shi et al., 2019). O derivado já apresenta diversos estudos, inclusive com resultados positivos em doenças pulmonares, como a DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) (Guan et al., 2018).

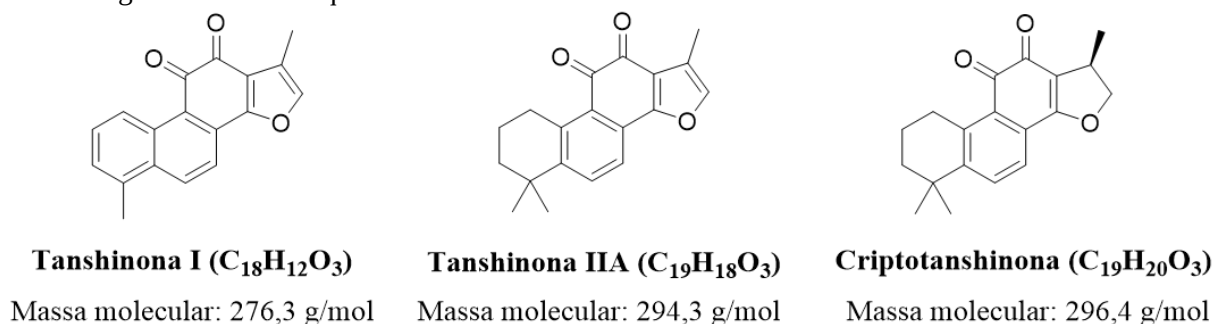
Figura 5. *Salvia milthiorriza* (Danshen) com destaque para a raiz, de onde são extraídas as tanshinonas.



Fonte: Giuliano, 2011.

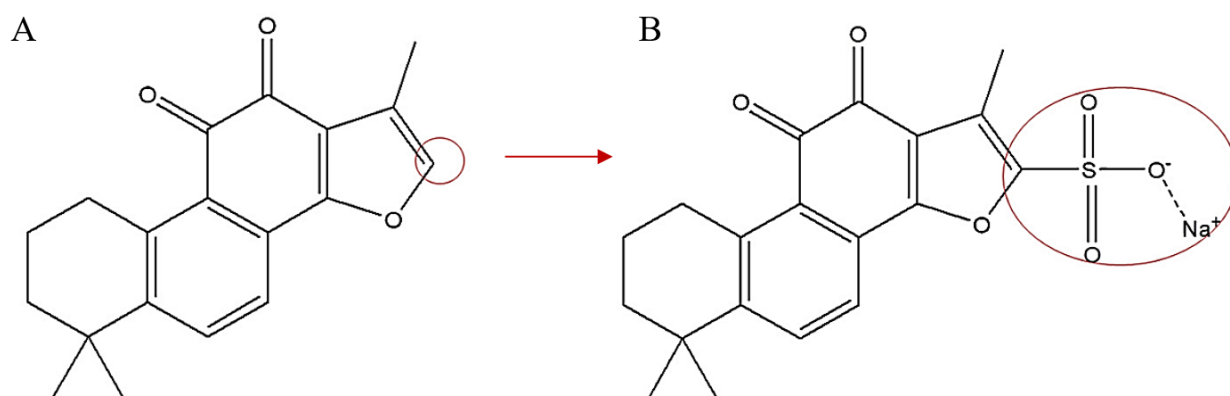
Existem dois principais compostos ativos: o lipofílico (Tanshinona I, IIA, IIB; criptotanshinona; e outros compostos relacionados) e os hidrofílicos (ácidos polifenólicos, danshensu, aldeído protocatecuico e ácido protocatecuico (Shang et al., 2012). As tanshinonas que foram estudadas nesse trabalho são as lipofílicas, tanshinona I (TI), tanshinona IIA (TIIA) e criptotanshinona (CPT) (Figura 6). Essas 3 substâncias são bem parecidas entre si, mudando apenas o sistema de conjugação entre elas e o número de carbonos e hidrogênios, sendo: Tanshinona I – $C_{18}H_{12}O_3$, Tanshinona IIA – $C_{19}H_{18}O_3$ e Criptotanshinona – $C_{19}H_{20}O_3$. A tanshinona IIA é a mais estudada dentre elas e existem até alguns artigos de revisão resumindo os estudos que demonstram as suas atividades, como os grupos de Guo et al e Ansari et al, ambos publicados em 2020 (Ansari et al., 2020; Guo et al., 2020).

Figura 6. Estrutura química e massa molecular das tanshinonas estudadas neste trabalho.



A tanshinona IIA já é utilizada como medicamento através de seu derivado solúvel em água, o Sulfonato de Sódio Tanshinona IIA (STS) (Figura 7) na forma de injeção para doença cardíaca coronária, infarto do miocárdio e angina de peito na China. Zhou et al, em 2019 realizou uma revisão sistemática de muitos trabalhos envolvendo a pesquisa de TIIA e seu derivado solúvel, mostrando que assim como a solubilidade, a atividade farmacológica também mudou devido a alteração da estrutura. STS se mostrou eficaz em doenças como DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica), sepse, MDV (vírus da doença de Marek), PRRSV (vírus da síndrome respiratória e reprodutiva porcina), reparação da pele, insolação e choque, degeneração macular relaciona à idade, esquistossomose, síndrome pós-menopausa, entre outros (Zhou et al., 2019). Em outra revisão sistemática também foi concluído que há benefícios no uso de STS, mas ainda há diversas dúvidas devido à escassez de estudos e também de qualidade nos ensaios, apesar de ainda não terem sido registrados efeitos adversos graves (Yu et al., 2020).

Figura 7. Estrutura química da Tanshinona IIA (A) e seu derivado solúvel Sulfonato de Sódio Tanshinona IIA (B).



Fonte: Adaptada de (Zhou et al., 2019)

1.6.1 A atividade antimicrobiana das tanshinonas

Lee et al em 1999 já mostraram que as atividades antibacterianas das tanshinonas de Danshen poderiam ser devido aos radicais superóxidos gerados, e também à inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas no modelo estudado *Bacillus subtilis*, mas também apresentaram atividade frente a outras bactérias (Lee et al., 1999). Em 2009 outros pesquisadores demonstraram que a CPT tem atividade bacteriostática frente diversas cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), provavelmente também devido à geração de radicais de oxigênio (Feng et al., 2009). Em 2017 foi sintetizado um derivado da TI para avaliar o efeito frente *S. aureus* e outras bactérias, e foi demonstrado que em *S. aureus* teve efeito bacteriostático danificando a integridade da membrana celular, e ainda sugerido que o composto fosse utilizado em combinação com outros antibióticos normalmente utilizados na terapia para uma sinergia de atividades levando ao acúmulo de antibióticos dentro da célula bacteriana (Wang et al., 2017).

Em 2012, 7 compostos isolados de Danshen mostraram efeitos inibitórios contra as principais proteases de SARS-CoV, sendo a TI a mais potente entre as substâncias testadas (Park et al., 2012). TIHA isolada também já demonstrou atividade antimicrobiana, porém frente ao subtipo 1 do vírus da imunodeficiência humana – HIV, inibindo sua transativação através da ativação da via do Nrf2 e AMPK/Nampt (Zhang et al., 2014).

2. Justificativa

Vítimas da doença no início de seu aparecimento sofreram sem o tratamento adequado, até surgir o pneumotórax e, posteriormente, a quimioterapia (Rosemberg, 1999). No período de 1990 a 2015, uma estratégia registrou progressos consideráveis na luta contra a TB, porém, após esses 25 anos, a tuberculose se tornou a doença infecciosa que mais mata em todo o mundo, superando a AIDS (Barreira, 2018). As razões para essa falta de controle da TB vão desde carência diagnóstica até falha terapêutica (World Health Organization, 2016) e o número de pessoas infectadas com TB vem crescendo nos últimos anos, sendo relatado em 2019 7,1 milhões de pessoas diagnosticadas. Apesar de tudo isso, desde 2000 o tratamento da TB evitou mais de 63 milhões de mortes no mundo, por isso é tão necessário que sejam desenvolvidos tratamentos mais curtos e simples. A OMS declara urgência no desenvolvimento de novos agentes anti-TB com novos mecanismos de ação, e recomenda que estes possuam redução do período de tratamento, efeito em microrganismos resistentes, ter boa biodisponibilidade em estado de latência e ser acessível em relação ao seu custo (World

Health Organization, 2020). No geral, os pacientes com tuberculose resistente precisam, de 14 mil comprimidos, 6 meses de injeções diárias, além de 2 infusões intravenosas que podem variar de 6 a 24 meses de tratamento, sem nenhuma garantia de cura, pois apenas cerca de 56% das pessoas tem sucesso nessa terapia (TB Alliance, 2021).

Os produtos naturais são, historicamente, fonte de quase todas as preparações medicinais (Harvey et al., 2015), tanto que, não somente o primeiro antibiótico é de origem natural, mas também o primeiro contra TB, a estreptomicina (Bloom and Murray, 1992; Schatz et al., 1944).

Há um interesse crescente nos extratos de plantas - por exemplo, em como o uso da medicina tradicional chinesa (TCM) pode orientar a descoberta de novos medicamentos (Harvey et al., 2015) e há potencial para futuras descobertas de plantas que podem apresentar potencial, e que ainda não foram estudadas para algumas bioatividades.

As tanshinonas aqui apresentadas já possuem estudos de mecanismo de ação recentemente publicados, agindo via ruptura da superfície do envelope celular e estresse oxidativo (Sieniawska et al., 2021).

Maciel et al, em um artigo de opinião publicado em 2020, acreditam que o Brasil não conseguirá atingir a meta da Estratégia Fim da TB até 2035. Segundo eles, analisando a taxa de diagnóstico e incidência de TB nos dois estados que mais contribuem com os números da epidemia no Brasil em 2019, fica claro que está aumentando e que a tendência é piorar com o cenário atual da pandemia (Maciel et al., 2020), por esse e outros motivos, com o objetivo de contribuir para o avanço da pesquisa e desenvolvimento, e principalmente, em busca de uma nova terapia contra TB, neste trabalho optou-se pela utilização de 3 substâncias de origem natural, escolhidas a partir de uma biblioteca de produtos naturais, a TargetMol®.

3. Objetivos

Avaliar o potencial anti-*Mycobacterium tuberculosis* de compostos naturais selecionados de uma biblioteca de produtos naturais, e em seguida avaliar a segurança dos compostos promissores.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a CIM₉₀ em aerobiose de 76 compostos da biblioteca comercial TargetMol®;

- Determinar o Índice de Citotoxicidade (IC₅₀) dos compostos que apresentarem CIM₉₀ ≤10 µg/mL frente as linhagens celulares MRC-5 (ATCC CCL-171), J774A.1 (ATCC TIB-67) e HepG2 (ATCC HB-8065).
- Determinar o Índice de Seletividade (IS) para definir quais compostos seguirão para as próximas etapas;
 - Determinar o espectro de ação utilizando os modelos *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).
 - Avaliar a atividade dos compostos frente outras micobactérias;
 - Determinar a CIM₉₀ em 10 isolados clínicos classificados como RR-TB, MDR-TB, pré-XDR e XDR-TB;
 - Determinar a concentração inibitória fracionada dos compostos com rifampicina;
 - Avaliar a toxicidade aguda dos compostos *in vivo* em modelo larval *Galleria mellonella*.

4. Referências bibliográficas

- Ankrah, A.O. *et al.* Tuberculosis. Semin. Nucl. Med. 48, 108–130, 2018.
DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2017.10.005
- Ansari, M.A. *et al.* Prospective therapeutic potential of Tanshinone IIA: An updated overview. Pharmacol. Res. 105364, 2020. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105364
- Ashour, A.A. *et al.* Enhanced oral bioavailability of Tanshinone IIA using lipid nanocapsules: Formulation, in-vitro appraisal and pharmacokinetics. Int. J. Pharm. 586, 119598, 2020.
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119598
- Barreira, D. Os desafios para a eliminação da tuberculose no Brasil. Epidemiol. e Serv. saúde Rev. do Sist. Único Saúde do Bras. 27, e00100009, 2018.
DOI: 10.5123/s1679-49742018000100009
- Bloom, B.R., Murray, C.J.L. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. Science - 257, 1055–1064, 1992. DOI: 10.1126/science.257.5073.1055
- Brasil. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde, Brasília, 2019.
- Cai, Y. *et al.* Recent insights into the biological activities and drug delivery systems of tanshinones. Int. J. Nanomedicine 11, 121–130, 2016. DOI: 10.2147/IJN.S84035
- Cao, J. *et al.* ‘Adhesion and Release’ Nanoparticle-Mediated Efficient Inhibition of Platelet Activation Disrupts Endothelial Barriers for Enhanced Drug Delivery in Tumors. Biomaterials 269, 120620, 2020. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120620
- Crisan-Dabija, R. *et al.* Tuberculosis and COVID-19 in 2020: Lessons from the past viral outbreaks and possible future outcomes. Canadian Respir. Journal, 2020.
DOI: 10.1101/2020.04.28.20082917
- Daniel, T.M. The history of tuberculosis. Respir. Med. 100, 1862–1870, 2006.
DOI: 10.1016/j.rmed.2006.08.006
- Dara, M. *et al.* New diseases and old threats: lessons from tuberculosis for the COVID-19 response. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 544–545, 2020. DOI: 10.5588/ijtld.20.0151
- Feng, H. *et al.* Genome-wide transcriptional profiling of the response of staphylococcus aureus to cryptotanshinone. J. Biomed. Biotechnol, 2009. DOI: 10.1155/2009/617509
- Gao, H. *et al.* Simultaneous purification of dihydrotanshinone, tanshinone I, cryptotanshinone, and tanshinone IIA from Salvia miltiorrhiza and their anti-inflammatory activities investigation. Sci. Rep. 8, 1–13, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-018-26828-0
- Gao, Y. *et al.* Association between tuberculosis and COVID-19 severity and mortality: A rapid systematic review and meta-analysis. J. Med. Virol. 93, 194–196, 2021.

DOI: 10.1002/jmv.26311

Giuliano, V. Focus on phytosubstances – Danshen root – amazing properties of salvia miltiorrhiza Bunge. *Aging sciences*, 26 de dezembro de 2011. Disponível em: <https://www.anti-agingfirewalls.com/2011/12/26/focus-on-phytosubstances-%E2%80%93-danshen-root-amazing-properties-of-salvia-miltiorrhiza-bunge/>. Acessado em: 13/08/2021

Gong, Y. *et al.* Bioactive tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* inhibit the growth of prostate cancer cells in vitro and in mice. *Int. J. Cancer* 129, 1042–1052, 2011.

DOI: 10.1002/ijc.25678

Gordon, S. V., Parish, T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology* 24–26, 2018. DOI: 10.1099/mic.0.000601

Gradmann, C. Robert Koch and the white death: From tuberculosis to tuberculin. *Microbes Infect.* 8, 294–301, 2006. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.06.004

Guan, R. *et al.* Sodium tanshinone IIA sulfonate decreases cigarette smoke-induced inflammation and oxidative stress via blocking the activation of MAPK/HIF-1 α signaling pathway. *Front. Pharmacol.* 9, 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.00263

Guo, R. *et al.* Pharmacological activity and mechanism of tanshinone iia in related diseases. *Drug Des. Devel. Ther.* 14, 4735–4748, 2020. DOI: 10.2147/DDDT.S266911

Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R., Quinn, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 111–129, 2015.

DOI: 10.1038/nrd4510

Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5

Lee, D.S. *et al.* Antibacterial activities of cryptotanshinone and dihydrotanshinone i from a medicinal herb, *salvia miltiorrhiza bunge*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 2236–2239, 1999. DOI: 10.1271/bbb.63.2236

Li, H. *et al.* A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen. *Biomed. Pharmacother.* 137, 111332, 2021.

DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111332

Maciel, E.L.N., Gonçalves Júnior, E., Dalcolmo, M.M.P. Tuberculose e coronavírus: o que sabemos? *Epidemiol. e Serv. saude Rev. do Sist. Unico Saude do Bras.* 29, e2020128, 2020. DOI: 10.5123/S1679-49742020000200010

Meyerowitz, E.A. *et al.* Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann. Intern. Med.* 174, 69–79, 2021. DOI: 10.7326/M20-5008

Nachiappan, A.C. *et al.* Pulmonary tuberculosis: Role of radiology in diagnosis and management. *Radiographics* 37, 52–72, 2017. DOI: 10.1148/rg.2017160032

- Nguyen, L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Arch. Toxicol.* 90, 1585–1604, 2016. DOI: 10.1007/s00204-016-1727-6
- PAHO. COVID-19 destaca necessidade urgente de reiniciar esforço global para acabar com tuberculose. Organização Pan-Americana de Saúde. Genebra, 23 de março de 2021. Disponível: <https://www.paho.org/pt/noticias/23-3-2021-covid-19-destaca-necessidade-urgente-reiniciar-esforco-global-para-acabar-com>. Acessado em 01 de julho de 2021
- Park, J.Y. *et al.* Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases. *Bioorganic Med. Chem.* 20, 5928–5935, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.07.038
- Ren, J. *et al.* *Salvia miltiorrhiza* in Treating Cardiovascular Diseases: A Review on Its Pharmacological and Clinical Applications. *Front. Pharmacol.* 10, 1–15, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00753
- Ribeiro, C.M. Perfil de resistência a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. Orientador: Fernando R. Pavan. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2018.
- Rosemberg, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. *Boletim de Pneumologia Sanitária* – Vol. 9 – Nº 1 – jan/jun – 2001. DOI: 10.5123/s0103-460x2001000100005
- Rosemberg, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Boletim de Pneumologia Sanitária* Vol. 7, Nº 2 – jul/dez – 1999. DOI: 10.5123/s0103-460x1999000200002
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 3–6, 1944. DOI: 10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe
- Shang, Q., Xu, H., Huang, L. Tanshinone IIA: A promising natural cardioprotective agent. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* vol. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/716459
- Shi, M.J. *et al.* Preventive and therapeutic role of Tanshinone IIA in hepatology. *Biomed. Pharmacother.* 112, 108676, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108676
- Sieniawska, E. *et al.* Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* inhibit *Mycobacterium tuberculosis* via disruption of the cell envelope surface and oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* 104743, 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112405
- Stochino, C. *et al.* Clinical characteristics of COVID-19 and active tuberculosis co-infection in an Italian reference hospital. *Eur. Respir. Journal*, 56, 2020. DOI: 10.1183/13993003.01708-2020

- TB Alliance. Why new TB Drugs?. Antimicrobial Resistance. New York: TB Alliance, 2021. Disponível em: <https://www.tballiance.org/why-new-tb-drugs/antimicrobial-resistance>. Acessado em: 13/08/2021
- Vasava, M.S. *et al.* Drug development against tuberculosis: Past, present and future. *Indian J. Tuberc.* 64, 252–275, 2017. DOI: 10.1016/j.ijtb.2017.03.002
- Walaza, S. *et al.* Influenza and tuberculosis co-infection: A systematic review. *Influenza Other Respi. Viruses* 14, 77–91, 2020. DOI: 10.1111/irv.12670
- Wang, D. *et al.* A tanshinone I derivative enhances the activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Res. Microbiol.* 168, 46–54, 2017. DOI: 10.1016/j.resmic.2016.08.002
- World Health Organization, 2021. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis.
- World Health Organization. Global tuberculosis report 2020.
- World Health Organization. Global tuberculosis report 2019.
- World Health Organization. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017.
- World Health Organization. Global tuberculosis report 2016.
- Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265–269, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3
- Xing, L. *et al.* Bioavailability and pharmacokinetic comparison of tanshinones between two formulations of *Salvia miltiorrhiza* in healthy volunteers. *Sci. Rep.* 7, 1–10, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02747-4
- Younga, D., Verreck, F.A.W. Creativity in tuberculosis research and discovery. *Tuberculosis* 92, 14–16, 2012. DOI: 10.1016/S1472-9792(12)70006-9
- Yu, M. *et al.* Sodium Tanshinone II A Sulfonate for Coronary Heart Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Chin. J. Integr. Med.* 26, 219–226, 2020. DOI: 10.1007/s11655-018-2556-7
- Zhang, H.S. *et al.* Tanshinone II A inhibits tat-induced HIV-1 transactivation through redox-regulated AMPK/Nampt pathway. *J. Cell. Physiol.* 229, 1193–1201, 2014. DOI: 10.1002/jcp.24552
- Zhou, Z.Y. *et al.* Sodium tanshinone IIA sulfonate: A review of pharmacological activity and pharmacokinetics. *Biomed. Pharmacother.* 118, 109362, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109362

Capítulo II

***Anti-Mycobacterium tuberculosis* potential of compounds isolated
from *Salvia milthiorriza* (Danshen)**

Giulia Polinário^a, Débora L. Campos^a, Camila M. Ribeiro^a, Emanuela A. Morandim^a,
Karyn F. Manieri^a, Maiara A. B. C. Rosa^a, Tamara R. M. Ribeiro^a, Liliana L. S. Moraes^b,
Cristiano G. Moreira^a, Marli M. A. de Campos^b, Fernando R. Pavan^{a*}

^a *Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences (FCFAR), São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.*

^b *Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.*

* *Corresponding author: Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01, Campos Ville, CEP 14800-903, Araraquara-SP, Brazil. Phone number +55 16 33014671. Email address: fernando.pavan@unesp.br*

ABSTRACT

CONTEXT: *Mycobacterium tuberculosis* is the main etiological agent of the disease "Tuberculosis", which is currently responsible for 1/3 of deaths caused by antibiotic resistance, requiring approximately 6 months to 2 years of treatment, with about 14,000 pills, 6 months of daily injections, and 2 intravenous infusions, with no guarantee of cure.

OBJECTIVE: To evaluate the potential of Tanshinone I (TI), Tanshinone IIA (TIIA) and Cryptotanshinone (CPT) and assess the safety *in vitro* and *in vivo*.

STUDY DESIGN AND METHODS: From a library of natural compounds, TargetMol®, of 76 compounds, we found the most promising compounds being TI, TIIA and CPT, the main liposoluble constituents isolated from *Salvia miltiorrhiza*. They were subjected to initial experiments of minimal inhibitory concentrations (MIC₉₀) and cytotoxicity index (CI₅₀) to analyze your selectivity index (SI). Then, were tested against gram-positive, gram-negative and yeast models, besides other mycobacteria. Was also analyzed the fractional inhibitory concentration index (FICI) when combined with rifampicin, a first-line drug. And finally, the compounds were tested for their acute toxicity against *Galleria mellonella* larval model.

RESULTS: The MIC₉₀ of the compounds was 1.03; 0.38 and 1.21 µg/mL, for TI, TIIA and CPT, respectively, with very low cytotoxicity and high SI. The results against resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* were quite satisfactory, with the 3 tanshinones showing MIC₉₀ smaller than 3 µg/mL in at least 5 of 9 tested. The activity spectrum of compounds was classified as narrow due to non-activity in gram-negative, gram-positive and yeast models, as well as another genus of mycobacteria used. Still, showed MIC₉₀ around 0.3 µg/mL against *M. bovis*, which have 99.55% of structural similarity with *M. tuberculosis*. As a result of FICI, was presented synergism for TI and neutrality for TIIA and CPT. The *in vivo* toxicity against *Galleria mellonella* with a concentration of 2,000 mg/kg of body weight, did not show any death within 120 hours of observation.

CONCLUSION: In conclusion, we present results of 3 natural compounds widely studied, but that show promise in the search for alternatives to tuberculosis therapies.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, natural products, anti-tuberculosis activity, Tanshinone I, Tanshinone IIA, Cryptotanshinone.

1. Introduction

First described by Robert Koch in 1882, *Mycobacterium tuberculosis* presents itself as a slow-growing aerobic bacillus, causing an extremely lethal infectious disease (Gordon and Parish, 2018). Tuberculosis (TB) is historically the cause of many deaths around the world and remains a major health problem globally, making about 10 million people sick per year in the last years (WHO, 2019). According to the latest World Health Organization (WHO) report, *M. tuberculosis* currently affects about a quarter of the world's population and can be acquired by anyone, anywhere, as the bacteria spreads when a carrier expels the bacilli into the air, for example, coughing (WHO, 2020).

The bacillus has a highly lipophilic and impermeable cell wall, which makes it much less accessible and more resistant to therapeutic agents, but in addition to this intrinsic resistance, it can also have acquired and phenotypic resistance, resulting not only in limiting the use of available antibiotics, but also in the difficulty in developing new drugs (Nguyen, 2016).

Rifampicin-resistant TB (RR-TB) is a growing problem, being diagnosed in about half a million people in 2019. Of those, 78% had multi-drug resistant TB (MDR-TB), that is, they were resistant to rifampicin and isoniazid, which are 2 of the 4 main drugs used in first-line treatment (WHO, 2020). Still, there are bacilli called extensively resistant (XDR-TB), where in addition to resistance against the mentioned first-line drugs, they also show resistance against any drug from the most potent group of second-line drugs, "Group A", which includes levofloxacin, moxifloxacin, bedaquiline and linezolid. If the strain is resistant to rifampicin, isoniazid, and any fluoroquinolone or second-line drugs, they are called pre-XDR-TB (WHO, 2021). The new classification is intended to improve monitoring and treatment for this and all other types of resistance. It is important that these terms are understood, not only for academic reasons, but also to highlight the facts that, besides being much more expensive to treat with second-line drugs, they are even more toxic, less effective, more extensive and with a greater chance of dropping out of therapy.

The simplest treatment currently has a combination therapy for at least 6 months, 2 of which are necessarily intensive treatment and 4 months of maintenance (WHO, 2017), but when the bacillus is already drug-resistant, patients need, on average, 14,000 pills, 6 months of daily injections, plus 2 intravenous infusions that can range from 6 to 24 months of treatment, with no guarantee of a cure, as only about 56% of people are successful with this therapy (TB Alliance, 2021). Based on the current trajectory, by 2050, only MDR-TB and XDR-TB will be responsible for 2.5 million deaths per year (Reid et al., 2019).

The number of people infected with TB in the world has been growing in recent years, and in 2019, 7.1 million people were diagnosed (WHO, 2020), and the COVID-19 pandemic may further

increase that number. According to the 2020 global report, there has been a large reduction in the number of diagnosed cases in the 4 countries that account for 44% of global TB cases (India, Indonesia, Philippines and South Africa), and the trend is to get worse. The WHO even ventures to say that, due to the pandemic, the number of people who will develop TB could increase by more than 1 million people per year in the period 2020-2025, due to malnutrition and the drop in GDP per capita (WHO, 2020).

Natural products are historically the source of almost all medicinal preparations (Harvey et al., 2015), so much so that not only is the first antibiotic of natural origin, but also the first against TB, streptomycin (Bloom and Murray, 1992; Schatz et al., 1944). There is growing interest in plant extracts - for example, in how the use of traditional Chinese medicine (TCM) can guide the discovery of new medicines and there is potential for future discoveries of plants that may have potential, and have not yet been studied for some bioactivities (Harvey et al., 2015).

The compounds studied here are the 3 main liposoluble constituents isolated from *Salvia miltiorrhiza* (Xing et al., 2017), a traditional Chinese herb with over 1000 years of clinical application to treat various diseases in China (Gao et al., 2018; Gong et al., 2011). There are two main active compounds: lipophilic (Tanshinone I, IIA, IIB; Cryptotanshinone; and other related compounds) and hydrophilic (polyphenolic acids, danshensu, protocatechuic aldehyde and protocatechuic acid) (Shang et al., 2012). The tanshinones being studied in this work are the lipophilic ones, Tanshinone I (TI), Tanshinone IIA (TIIA) and Cryptotanshinone (CPT). These 3 substances are very similar to each other, changing only the conjugation system between them and the number of carbons and hydrogens, being: TI – $C_{18}H_{12}O_3$, TIIA – $C_{19}H_{18}O_3$ and CPT – $C_{19}H_{20}O_3$.

There are already more than 40 isolated and identified tanshinones with the development of phytochemical separation technology (Pang et al., 2016), and the 3 selected in this work already demonstrate several proven activities. Li et al (2020) published a review with the pharmacological basis of some of the biological activities, which are in general: anticancer activity; cardiovascular, cerebral, hepatic and renal protection; osteoporosis and others. Tanshinone IIA is the most studied among them and presents mainly antioxidant, anti-inflammatory, antiangiogenic, and anticancer activities. (Li et al., 2021).

The poor water solubility and low oral bioavailability of tanshinones have limited their clinical applications (Cai et al., 2016), but new delivery systems are being considered, including liposomes, solid dispersion, nanoparticles (NPs) and lipid nanocapsules (LNCs) (Ashour et al., 2020; Cao et al., 2020). Tanshinone IIA already has a more water-soluble derivative and, consequently, more easily distributed, Tanshinone Sodium Sulfonate IIA (STS) (Shi et al., 2019). The derivative already has

several studies, including positive results in lung diseases such as COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) (Guan et al., 2018).

2. Material and methods

2.1 Selection of compounds

The compounds were purchased from a commercial library of natural compounds, TargetMol®. The library provides us with prior structure information, as well as RMN (Nuclear Magnetic Resonance) and HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) data, validating its purity.

2.2 Bacterial strains

The bacterial strains used during the development of this work were stored in the Biosafety Level 3 Laboratory (BSL3), in cryotubes frozen at -80°C in 7H9 culture medium supplemented with 20% glycerol.

The strains used were:

- Standard sensitive strain of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294);
- Resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Instituto Clemente Ferreira (CF), classified as MDR-TB, pre-XDR and XDR-TB;
- Sensitive strain of *Mycobacterium smegmatis*: mc²155 (ATCC 700084);
- Sensitive strain of *Mycobacterium bovis* AN5;
- Sensitive strain of *Mycobacterium abscessus*;
- Sensitive strain of *Mycobacterium massiliensis*;
- Sensitive strain of *Mycobacterium fortuitum*.

2.3 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC₉₀) in aerobiosis

Resazurin microdilution assay methodology (REMA, Resazurin Microtiter Assay) was used to determine the anti-*M. tuberculosis* activity of the compounds (Palomino et al., 2002). Stock solutions of the compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in Middlebrook 7H9 broth at the moment of the experiment to obtain the initial concentration of each compound of 25 µg/mL. The experiment was realized with the standard strain H₃₇Rv and with the resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*. The bacteria dilution was made from the culture with a turbidity of 1.0 McFarland, diluted in 1:100, through dilution calculation, considering 1.0 McFarland = 8.8x10⁶ CFU/mL. As a positive control, a rifampicin solution at an initial concentration of 1 µg/mL was used, because the rifampicin has MIC₉₀ of around 0.04 µg/mL.

Resazurin developer was applied at a concentration of 0.01%, and only after 24h the fluorescence read was obtained with excitation at 530nm and emission at 590nm in the Cytation™ 3 (Biotek Instruments). The result will be demonstrated as the average of 3 independent replicates.

The ideal concentration to approve a substance is $\leq 10 \mu\text{g/mL}$, that is, the approved substances were able to inhibit 90% or more of the growth of *M. tuberculosis* with such concentration in the medium (Pavan et al., 2012).

2.4 Cytotoxicity assay (IC₅₀)

Cells were grown in cell culture bottles, with DMEM culture medium for MRC-5 (ATCC CCL-171), and Hep-G2 (ATCC HB-8065); and RPMI for J774A.1 (ATCC TIB-67), both supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) and 1% antibiotic [gentamicin sulfate (50 mg/L) and amphotericin B (2 mg/L)]. The methodology used was the microdilution method standardized by Pavan et al., 2010 (Pavan *et al.*, 2010). The concentration was 1×10^6 cells/mL for each of the cell lines. The initial concentration of each substance was 100 $\mu\text{g/mL}$.

Resazurin developer was applied at a concentration of 0.01%, and only after 4h the fluorescence read was obtained with excitation at 530nm and emission at 590nm in the Cytation™ 3 (Biotek Instruments). The result will be demonstrated as the average of 3 independent replicates.

In vitro cytotoxicity assay (IC₅₀) was defined as the highest concentration that allows 50% cell viability.

2.5 Determination of the Selectivity Index (SI)

To select the promising compounds, the simple IC₅₀/MIC₉₀ calculation was applied were compounds that presented an $IS \geq 10$, were selected for the next studies (Orme, 2001; Pavan et al., 2012).

2.6 Determination of the spectrum of action

All experiments were carried out using ATCC strains and according to the CLSI manual “Methods for antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically” (CLSI, 2015). Four different bacteria representing gram-positive and negative classes were selected, were: *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and one model of yeast, *Candida albicans* (ATCC 90028). The strains of gram-positive and gram-negative bacteria were cultivated in liquid LB medium for 20h under agitation and diluted to 5×10^5 CFU/mL. The control used was gentamicin, a drug from the aminoglycoside group. After 24h the absorbance was obtained with wavelength at 600 nm in the Cytation™ 3 (Biotek Instruments). The yeast was cultivated in Sabourad dextrose broth and diluted to 2×10^3 CFU/mL. The control used was Amphotericin B, an antifungal drug. After 48h of incubation,

resazurin developer was applied at a concentration of 0.01%, and only after 1h the fluorescence was obtained with excitation at 530nm and emission at 590nm in the Cytation™ 3 (Biotek Instruments) (Liu et al., 2007). The result will be demonstrated as the average of 3 independent replicates.

2.7 Evaluation of the activity of compounds against other mycobacteria

The mycobacteria used were *M. bovis* and *M. smegmatis*. The test was performed as described in item 2.3 (Palomino et al., 2002).

The initial concentration of tanshinones was 25 µg/mL. The microplates were incubated in a humidified incubator, 37°C, 5% CO₂ for 7 days for *M. bovis* and 2 days for *M. smegmatis*. After this period, resazurin developer was applied at a concentration of 0.01%, and only after 24h (*M. bovis*) or 2h (*M. smegmatis*) the fluorescence read was obtained with excitation at 530nm and emission at 590nm in the Cytation™ 3 (Biotek Instruments). The result will be demonstrated as the average of 3 independent replicates.

2.8 Determination of fractional inhibitory concentration index (FICI)

The experiment was performed according to “Resazurin drugs combination microtiter assay” (REDCA), by Callefi-Ferracioli et al (2013). The initial concentration for tanshinones was 10 µg/mL, and 1 µg/mL for rifampicin, so that the MIC₉₀ of the substances were reached. The *M. tuberculosis* standard H₃₇Rv strain was used (Caleffi-Ferracioli et al., 2013). The result will be demonstrated as the average of 3 independent replicates.

2.9 Assessment of acute toxicity in *Galleria mellonella*

Acute toxicity was evaluated according to the technique published by Ignasiak and Maxwell (2017). The control group received the vehicle used as the substance's solvent, DMSO. The larvae were treated with the compounds at a concentration of 2,000 mg/kg of body weight and followed for 120 hours, incubated in the dark at 37°C in Petri dishes and observed for 120 hours with intervals of 24 hours for their mortality. Those who were immobile, did not orientate themselves or when placed on their back did not respond to stimuli were considered dead. If no survival was observed, the study would be repeated with lower doses (Ignasiak and Maxwell, 2017). The result will be demonstrated as the average of 2 independent replicates.

3. Results and Discussion

The tanshinones were selected from a screening performed with 76 compounds from a commercial library of natural compounds, TargetMol®. The compounds were submitted to the initial evaluation of the MIC₉₀ with the sensitive standard strain H₃₇Rv (ATCC 27294). The compounds must be able to inhibit at least 90% of mycobacterial growth at a concentration less than or equal to

10µg/mL, and then they are considered able to proceed with the study (Orme, 2001; Pavan *et al*, 2012). Table 1 shows the MICs of all compounds that participated in the screening.

Table 1. Results of the Minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of the 76 compounds from the commercial library of natural compounds submitted to the screening, in µg/ml.

Compound	MIC ₉₀ (µg/mL)	Compound	MIC ₉₀ (µg/mL)
(+)- Bicuculline	> 25	Lappaconite HBr	> 25
(+)- Matrine	> 25	Methyl hesperidin	> 25
2-Methoxyestradiol	> 25	Myricetrin	> 25
4-Methylumbelliferone	> 25	Nobiletin	> 25
Acetovanillone	> 25	Oleuropein	> 25
Artemether	> 25	Oridonin	24.30 ± 0.99
Asiatic acid	11.61 ± 0.22	Orotic acid	> 25
Astragaloside I	> 25	Oxymatrine	> 25
Baicalin	> 25	Paclitaxel	> 25
Bilobalide	> 25	Paeoniflorin	> 25
Catharanthine	> 25	Paeonol	> 25
Celastrol	23.22 ± 2.52	Palmatine chloride	> 25
Chlorogenic acid	> 25	Phlorizin	> 25
Chrysophanic Acid	> 25	Piperlongumine	7.00 ± 3.36
Cryptotanshinone	1.21 ± 0.07	Polydatin	> 25
Curcumol	> 25	Puerarin	> 25
Cyclocytidine hydrochloride	> 25	Quercetin Dihydrate	> 25
Cytisine	> 25	Rotundine	> 25
Daidzein	> 25	Salicoside	> 25
Diacerein	> 25	Salidroside	> 25
Dihydromyricetin	> 25	SantacruzaMate A	> 25
Dioscin	> 25	Schizandrin B	> 25
Docetaxel	> 25	Sclareolide	> 25
Fisetin	> 25	Silibinin	> 25
Gastrodin	> 25	Silymarin	> 25
Genipin	> 25	Sinomenine	> 25
Geniposide	> 25	Sodium Danshensu	> 25
Geniposidic acid	> 25	Sophocarpine	> 25
Ginkgolide B	> 25	Tangeretin	> 25
Glycyrrhetic acid	> 25	Tanshinone I	1.03 ± 0.36
Gramine	> 25	Tanshinone IIA	0.38 ± 0.00
Hesperetin	> 25	Taxifolin	> 25
Hesperidin	> 25	Tetrahydropapaverine hydrochloride	> 25
Honokiol	10.15 ± 0.40	Troxerutin	> 25
Hordenine	> 25	Usnic Acid	15.00 ± 5.96
Indirubin	> 25	Vanillylacetone	> 25
Indole-3-carbinol	23.11 ± 2.67	Vincristine sulfate	> 25
L-Hyoscyamine	> 25	Yohimbine hydrochloride	> 25

Of the 76 compounds tested, only 4 presented the desired MIC₉₀, namely: Tanshinone I (TI), Tanshinone IIA (TIIA), Cryptotanshinone (CPT) and Piperlongumine (PLG), with MIC₉₀ of 1.03; 0.38; 1.21 and 7.00 µg/mL respectively, with TIIA being the most active among them all, followed by TI, CPT and finally, PLG.

In the sequence, was realized the assay of IC₅₀ with these promisors compounds, to observe how toxic is the substance tested against cell lines widely studied in cytotoxicity assays, and then, the selectivity index (SI) was calculated (Table 2).

Table 2. Results of MIC₉₀ and IC₅₀ of the compounds, followed by their respective SI (µg/mL).

Compounds	MIC ₉₀	MRC-5		J774A-1		Hep G2	
		IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI
Tanshinone I	1.03 ± 0.3	87.72 ± 1.8	85.11	87.66 ± 17.4	85.06	87.48 ± 17.7	84.88
Tanshinone IIA	0.38 ± 0.0	>100	> 263.4	>100	> 263.4	94.52 ± 7.7	248.97
Cryptotanshinone	1.21 ± 0.1	52.64 ± 6.2	43.53	85.71 ± 20.2	70.87	23.85 ± 1.0	19.73
Piperlongumine	7.00 ± 3.2	29.71 ± 3.9	4.24	19.15 ± 2.4	2.73	42.61 ± 1.5	6.09
Rifampicin	0,02 ± 0.0	>100	> 6076	>100	> 6076	>100	> 6076

In this study, 3 different continuous cell lines were used: MRC-5 (ATCC CCL-171), characterized as normal human lung fibroblasts, where the possible toxicity of a normal cell was observed; J774A.1 (ATCC TIB-67), characterized as mouse ascitic tumor macrophages, where we observed the damage that the compound can cause to this immune cell and Hep G2 (ATCC HB-8065), characterized as human hepatocellular carcinoma hepatocytes, where the damage the compound can cause after it is metabolized has been observed.

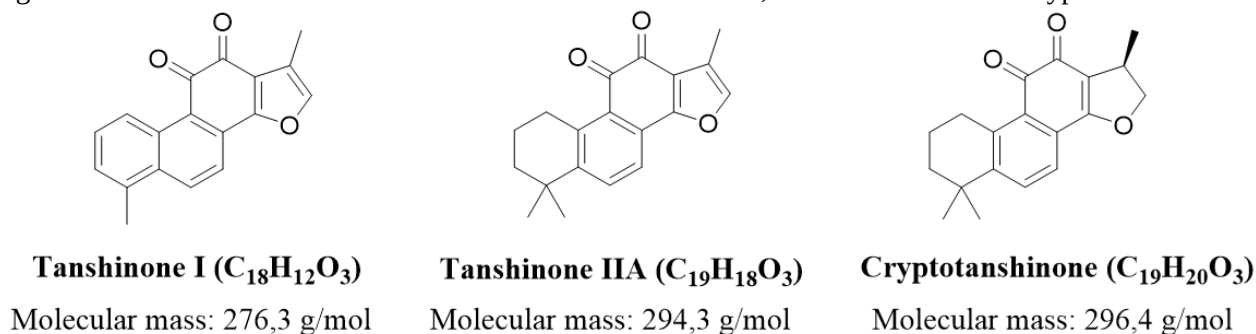
The evaluation of cytotoxicity of the 3 cell lines was realized with 24-hour exposure to the compounds. The tanshinones I and IIA presented low cytotoxicity with values of at least 87 µg/mL to start presenting some risk to the studied cells. Piperlongumine, on the other hand, had very low IC₅₀ values and a very high MIC₉₀, which results in an extremely low SI.

Cryptotanshinone showed more critical values, especially against liver cells, but was approximately 2x safer than desired, and it can be maintained in the trials. The lowest value presented against Hep G2 may be related to metabolic activities with the functioning of liver enzymes, which may contribute to increased toxicity (Knasmüller et al., 1998). Piperlongumine was eliminated as it did not have the desired cytotoxic safety.

Previous data showed that TI, TIIA and CPT exhibited significant cytotoxicity against several human tumor cell lines, probably due to the intact ring D and an *ortho*-quinone group (Wang et al., 2007). Still, CPT may be slightly more cytotoxic for having a dihydrofuran ring, instead of a furan-ring like TI and TIIA (Ryu et al., 1997).

The tanshinones showed low concentrations of inhibition, with values around 1.0 µg/mL. They are very similar to each other, just changing the conjugation system between them and the number of carbons and hydrogens, being: Tanshinone I – C₁₈H₁₂O₃, Tanshinone IIA – C₁₉H₁₈O₃ e Cryptotanshinone – C₁₉H₂₀O₃ (Figure 1).

Figure 1. Chemical structure and molecular mass of Tanshinone I, Tanshinone IIA and Cryptotanshinone.



Tanshinones, in general, are comprised of four rings, including naphthalene or tetrahydronaphthalene rings A and B, ortho- or para-naphthoquinone or lactone ring C, and a furan or dihydrofuran ring D (Wang et al, 2007), moreover, tanshinone I, IIA and cryptotanshinone are characterized by an ortho-quinone C-ring (Pang et al., 2016).

The best among them was TIIA, but the results are comparable or better than some drugs used in current therapy, like as Capreomycin (2 - 4 µg/mL); Pyrazinamide (16 – 50 µg/mL); Streptomycin (2 – 8 µg/mL); Ethambutol (1 – 5 µg/mL); p-aminosalicylic acid (0,5 µg/mL). The isoniazid, one of the most important drugs against TB, for example, presents MIC₉₀ = 0.02 – 0.2 µg/mL, like Tanshinone IIA (0.38 µg/mL) (da Silva and Palomino, 2011).

Previous studies demonstrated that the anti-TB activity is related to the quinone group, which is present in the 3 tanshinones (Luo 1988 *apud* Liu et al, 2012) and Sieniawska (2021) showed that the mechanism of action of tanshinones is via disruption of the cell envelope surface and oxidative stress, and the bacteria (Sieniawska et al., 2021). In 2012, Liu et al demonstrated that two different substitutions in the α-position of ring D of TI by Mannich reaction decreased significantly the MIC (Liu et al., 2012).

Spectrum of action

The compounds were tested against one model of yeast and others bacteria to evaluate the range of activity. The compounds were tested at a maximum concentration of 100µg/mL. The results are shown in table 3 below:

Table 3. Result of the average of 3 independent replicates of the MIC₉₀ assay performed according to the CLSI manual, with the species *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Candida albicans* (ATCC 90028).

Compound	MIC ₉₀ (µg/mL)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Tanshinone I	>100	>100	>100	>100	196.55
Tanshinone IIA	>100	>100	>100	>100	189.41
Cryptotanshinone	>100	>100	>100	>100	187.67
Gentamicin	1.56	0.78	1.17	0.97	-
Amphotericin B	-	-	-	-	0.43

There are still few studies of antimicrobial activity with these compounds. Zhao et al demonstrated the activity of tanshinones against some bacteria, including *E. coli*, but from another ATCC number, with MIC of 49.98 µg/mL for TI, 50 µg/mL for TIIA, and 12.5 µg/mL for CPT (Zhao et al., 2011). CPT has also shown activity against *S. aureus* before, but against the standard strain ATCC 25923, while in this work ATCC 6538 was used, which is a subspecies (Feng et al., 2009).

Still, against other strain of *C. albicans*, the ATCC 18804, Lee and Kim (2016) demonstrated MIC of 39 µg/mL, using the same technique, but with the ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza* (Lee and Kim, 2016).

The compounds, in this case, can be considered as molecules with low activity spectrum, since they did not inhibit 90% of the growth of the analyzed bacteria in their highest concentrations tested. In the yeast model, the concentrations for 90% of inhibition went for at least 187 µg/mL. Many studies on antimicrobial activities are still needed to know the potentials of these molecules, as activities in derivatives have already been observed (Wang et al., 2017).

We also analyzed the activity of the compounds against other mycobacteria to verify their possible selectivity (Table 4). The mycobacteria studied were the fast-growing ones, *Mycobacterium smegmatis*, *M. abscessus*, *M. massiliensis*, *M. fortuitum* and one slow-growing, *M. bovis*.

Table 4. MIC₉₀ of tanshinones against *M. smegmatis* and *M. bovis*.

Compound	MIC ₉₀ (µg/mL)				
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. fortuitum</i>
Tanshinone I	>25	0.27	62.5	62.5	62.5
Tanshinone IIA	>25	0.31	>125	>125	>125
Cryptotanshinone	>25	0.14	31.25	15.62	15.62

We observed that all tanshinones had MIC₉₀ below 0.5 µg/mL for *M. bovis*, which shows 99.55% similarity to *M. tuberculosis* (Portugal, 2014), and at the same time none of them were active against *M. smegmatis*, a non-pathogenic soil bacteria (Titgemeyer et al., 2007).

TIIA was not active at even the highest concentration tested on any of the other mycobacteria, while TI had MIC₉₀ of 62.5 µg/mL for them.

CPT had good MIC₉₀ values against *Mycobacterium abscessus*, which is the most pathogenic and chemotherapy-resistant rapidly growing mycobacterium, and comprises three subspecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, and *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Gutierrez and Somoskovi, 2014).

Mycobacterium fortuitum infections can usually be treated with a two-drug regimen based on in vitro susceptibility testing, and in this test was susceptible to CPT with MIC₉₀ of 15.62 µg/mL. This may include fluoroquinolones, doxycycline, amikacin, or sulfonamides. The *M. fortuitum* group has included the species: *M. fortuitum*, *M. peregrinum* and the so-called *M. fortuitum* group third biovariant complex (Gutierrez and Somoskovi, 2014).

MIC₉₀ against resistant clinical isolates

The test against resistant clinical strains is performed to understand the different resistance profiles and suggest a likely mechanism of action for the compounds under study. In this case, we used the first-line drugs Rifampicin (RFP) and Isoniazid (INH), besides moxifloxacin (MOX) as representant of fluoroquinolones, and amikacin (AMK) as representant of aminoglycoside, a second-line injectable drug. The results are presented in table 5.

Table 5. MIC₉₀ results of compounds and standard drugs against resistant clinical isolates.
*In bold MICs considered resistant to control drugs according to HEYSELL et al., 2015.

CF	MIC ₉₀ (µg/mL)						
	Tan I	Tan IIA	CPT	RFP	INH	AMK	MOX
44	>25	>25	>25	0.13±0.05	>25	<0.09	0.44±0.34
48	12.44±0.36	18.64±3.06	14.96±1.89	>25	>25	8.94±3.96	1.25±0.14
81	0.10±0.00	0.46±0.38	0.74±0.01	>25	>25	4.24±4.37	>25
105	0.27±0.11	2.85±3.47	6.40±8.54	> 25	> 25	0.54±0.23	> 0.08
110	>25	>25	>25	24.50±0.70	5.06±1.38	0.23±0.06	0.35±0.04
162	1.28±0.16	1.00±0.21	0.73±0.06	>25	>25	>25	12.84±17.18
165	0.98±0.22	1.93±1.27	0.36±0.01	>25	>25	3.12±0.53	0.16±0.01
169	1.58±1.24	2.07±0.97	2.44±0.01	>25	2.55±2.28	0.18±0.12	4.27±1.97
171	6.64±0.08	0.66±0.06	2.82±0.15	>25	>25	0.14±0.06	1.14±0.52
H ₃₇ Rv	1.03±0.36	0.38±0.00	1.21±0.07	0.02±0.01	-	-	-

CF: Resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Instituto Clemente Ferreira (CF).

The compounds, in general, were active in the resistant strains analyses with MIC₉₀ smaller than 1 µg/mL. The 3 tanshinones were equally active between them against two strains: CF 81, with MIC₉₀ values of 0.10 µg/mL, 0.46 µg/mL and 0.74 µg/mL for TI, TIIA and CPT, respectively, and CF 162, with MIC₉₀ values of 1.28 µg/mL, 1.0 µg/mL and 0.73 µg/mL for TI, TIIA and CPT, respectively.

The strains that obtained higher values of MIC₉₀ were CF 44, 48 and 110. For CF 44, resistant only to isoniazid, the tanshinones didn't demonstrate activity at the concentration tested. For CF 48, susceptible only to MOX with MIC₉₀ of 0.4 µg/mL, the tanshinones showed high values of MIC₉₀, being 12.44 µg/mL, 18.64 µg/mL and 14.96 µg/mL for TI, TIIA and CPT, respectively.

For CF 105, TI showed MIC₉₀ value of 0.27 µg/mL, comparable to AMK. TIIA and CPT exhibited the MIC₉₀ values of 2.85 µg/mL and 6.40 µg/mL, respectively. For 165 the MIC₉₀ values were 0.98, 1.93 and 0.36 µg/mL for TI, TIIA and CPT, respectively, being TI and CPT smaller than AMK. For CF 171 the MIC₉₀ values were 6.64, 0.66 and 2.82 µg/mL for TI, TIIA and CPT, respectively, being the MIC₉₀ value of TIIA similar to MOX. The MIC₉₀ values of tanshinones against CF 169 were around 2 µg/mL, higher than AMK, but this strain presented resistance for RFP, INH and MOX, and the compounds were active.

The values that defined the resistance in this work were determined by the MycoTB Plate assay (Heysell et al., 2015), presented in the following table:

Table 6. Minimum values for determination of phenotypic resistance against clinical strains of *M. tuberculosis*.

Compound	MIC ₉₀
Rifampicin (RFP)	2.0 µg/mL
Isoniazid (INH)	0.5 µg/mL
Amikacin (AMK)	4.0 µg/mL
Moxifloxacin (MOX)	2.0 µg/mL

Source: Adapted from HEYSELL *et al.*, 2015

In comparison with the standard strain, the TI showed a smaller value of MIC₉₀ for CF 81 and 105, which are XDR and MDR, respectively. Against CF 165 its MIC₉₀ was maintained, while for CFs 162 and 169 it had an increase of 24 and 54%, respectively, but these CFs presented resistance of the type XDR and pre-XDR, respectively.

Tanshinone IIA had MIC₉₀ values higher than against the standard strain, but almost all under 3 µg/mL. Its activity against strain 171 was the best among the tanshinones, being similar to one of the drugs already used, moxifloxacin. Still, it showed good results, less than 1 µg/mL, against CF 81 and 162, which are two XDR clinical isolates.

Cryptotanshinone, in turn, showed MIC₉₀ lower than against H₃₇Rv in three CFs tested, 81, 162 and 165, the first and second being XDR and the third sensitive to MOX and AMK, but CPT had an activity about 4x more potent than the aminoglycoside.

The strains studied in this work have already been analyzed through a kit that searches for the mutations that the strain may present, the GenoType (Ribeiro, 2018). The kit analyzes mutations in the *gyrA* and *rrs* genes, which act in the translation of protein and ribosomal RNA, respectively (Cole et al., 1998; Honore and Cole, 1994). Of the 9 strains presented here, 5 had no mutations detected in these 2 genes, strains 44, 48, 110, 165 and 169. Mutation in the *gyrA* gene can lead to resistance to fluoroquinolones (Takiff et al., 1994), as they act by inhibiting the enzyme DNA gyrase, which has one of the subunits encoded by *gyrA* (Drlica and Malik, 2005); while the strains that have mutations in the *rrs* gene are resistant to aminoglycosides (Jnawali et al., 2013), as these act by inhibiting protein synthesis (Palomino and Martin, 2014).

Mutations in these genes indicate different responses to known mechanisms of action, but do not signify obligatory resistance, since as we can see, strain 105 has a mutation in the *rrs* gene, but it did not show resistance to AMK. This also occurred with strain 171, which has mutations in the *gyrA* and *rrs* genes, without showing resistance to either MOX or AMK.

Only strain 162 showed agreement between mutations and resistance, as they have mutations in the *rrs* and *gyrA* genes, and showed resistance to both MOX and AMK. These strains showed resistance to other representatives of the aminoglycoside and fluoroquinolones classes in Ribeiro (2018).

Surprisingly, the 3 compounds studied showed similar and potent activity in all clinical isolates and the standard strain, except for CFs 44, 48 and 110. These data suggest that there are no cross-resistance problems, as they have activity in bacteria with resistance to different antimicrobials, showing that they may have different mechanisms of action from these drugs already used in the treatment of TB. The compounds, in general, showed very encouraging potential and, given the toxicity results, they make excellent candidates for further studies, since, so far, efforts to discover drugs for resistant TB are still ongoing, in order of finding safe drugs to fight this disease (Stephanie et al., 2021).

A total of 206,030 cases of MDR/RR-TB were reported in 2019 worldwide (WHO, 2020). Resistant TB rates have been declared a global threat by the WHO, representing a major challenge in the control and treatment of the disease. Technological breakthroughs are needed by 2025 to reduce the global incidence to an average 17% decline per year (WHO, 2019), and it is extremely important to study promising molecules in the treatment of cases of antimicrobial resistance and with a cytotoxic

safety as high as those presented in this work, and the possible mechanisms of action and the response of the bacteria to each tanshinone attack are already known.

Determination of fractional inhibitory concentration index (FICI)

This trial was included in this work because an important finding was recently published, demonstrating that TIIA can protect the liver and alleviate cholestasis caused by the use of rifampicin in the treatment of tuberculosis, through regulation of NTCP (cotransport polypeptide of Na⁺ taurocholate) expression and function, preventing RFP-induced cholestatic liver injury (Yang et al., 2020), and with that, we became interested in evaluating the activity of these two substances when they are combined against the bacillus.

Table 7. Results of the determination of fractional inhibitory concentration index (FICI).

Combination	FICI
Tan I + RFP	0.42 ± 0.1
Tan IIA + RFP	0.69 ± 0.1
CPT + RFP	0.97 ± 0.3

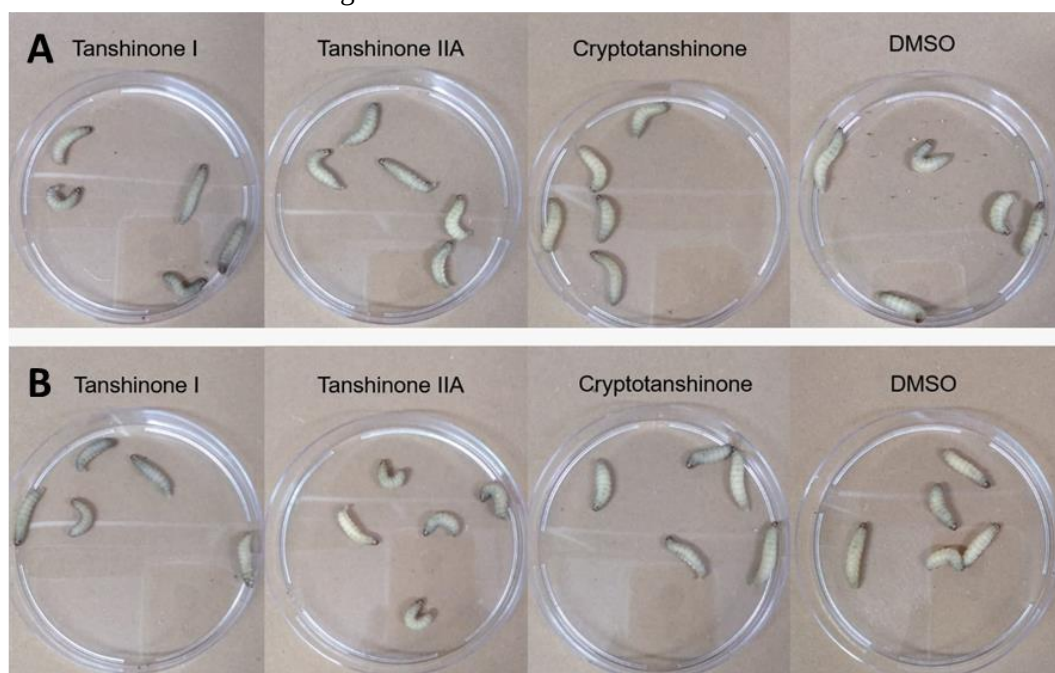
The result should be interpreted as synergism when $FICI \leq 0.50$; indifferent $> 0.50-4$; and antagonism > 4 , so we have that TI present synergism, while TIIA and CPT do not present difference when used in combination with rifampicin.

This data is too important because any new proposed anti-TB drug will be used in combination with other drugs to prevent the resistance (Chen et al., 2006). The compounds showed only positive results, with synergism for TI, that is, the compound or RFP activity was potentiated.

Still, given this result, we have no reason to believe that the use of TIIA in combination with RFP will bring benefits regarding the effectiveness of the treatment of TB, but it won't cause inhibition of the antimycobacterial activity of RFP and can be used for liver protection.

Acute in vivo toxicity in a larval model of *Galleria mellonella*

The in vivo acute toxicity analysis in a larval model of *Galleria mellonella* presented excellent results. The larvae were treated with the compounds at a concentration of 2,000 mg/kg of weight and followed for 120 hours, with observation at intervals of 24 hours, as proposed by Ignasiak and Maxwell (Ignasiak and Maxwell, 2017).

Figure 2. *Galleria mellonella* larvae.

A: Application day. B: 120h. From left to right: Tanshinone I, Tanshinone IIA, Cryptotanshinone, DMSO (diluent control). Source: Own authorship

After 120h of exposure to the compounds, a survival percentage of 100% was observed, including DMSO, used as a solvent for the compounds, which was used as a vehicle group. Thus, we can say that the compounds did not show toxicity in the *Galleria mellonella* alternative model, suggesting high cytotoxic safety.

Galleria mellonella larvae have been used for a long time in the research of new drugs because even without an adaptive immune response, it is a non-vertebrate model that has an innate immune response system similar to that of mammals (Wojda, 2017). The larvae have the advantage of being a quick method to screen for new antimicrobial drug candidates, it is easy to handle due to its large size (2 to 3 cm), thus allowing the infection to be carried out simply and still allowing for the collection of tissue/hemolymph for analysis. Authorization from the ethics board is not required to handle this experimental model and they do not require special equipment in the research laboratory (Tsai et al., 2016). Asai et al (2019) consider a reliable evaluation of TB pathogenesis and has the potential to be used to screen novel anti-TB drug and vaccine candidates in early development, reducing the overall number of animals in experimentation (Asai et al., 2019).

4. Conclusion

In general, the compounds showed good activity in the standard H₃₇Rv strain and even better performance in some clinical strains tested that are already resistant to the drugs currently used in treatment, in addition to showing high safety both at the cellular level and in the in vivo assay in a model larval of *Galleria mellonella*. It was also shown to have a short spectrum of action, being selective for some mycobacteria. Completing these first steps in the search for a new drug or a new adjuvant in tuberculosis therapy, we have 3 options of natural products that have the advantage of being already extensively studied, with know mechanism of action and with several actions already confirmed in numerous studies around the world, mainly in China, where one of the compounds is already being used clinically to help treat heart disease.

In fact, tanshinones have been studied for many decades, but despite already having previous MIC results, this work is a pioneer in demonstrating their anti-*Mycobacterium tuberculosis* potential, including resistant clinical isolates, and in vitro and in vivo toxicity.

5. References

- Asai, M. *et al.* Use of the invertebrate galleria mellonella as an infection model to study the mycobacterium tuberculosis complex. *J. Vis. Exp.* 2019, 1–8, 2019. DOI: 10.3791/59703
- Ashour, A.A. *et al.* Enhanced oral bioavailability of Tanshinone IIA using lipid nanocapsules: Formulation, in-vitro appraisal and pharmacokinetics. *Int. J. Pharm.* 586, 119598, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119598
- Bloom, B.R., Murray, C.J.L. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science* (80-.). 257, 1055–1064, 1992. DOI: 10.1126/science.257.5073.1055
- Cai, Y. *et al.* Recent insights into the biological activities and drug delivery systems of tanshinones. *Int. J. Nanomedicine* 11, 121–130, 2016. DOI: 10.2147/IJN.S84035
- Caleffi-Ferracioli, K.R. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis* 93, 660–663, 2013. DOI: 10.1016/j.tube.2013.09.001
- Cao, J. *et al.* ‘Adhesion and Release’ Nanoparticle-Mediated Efficient Inhibition of Platelet Activation Disrupts Endothelial Barriers for Enhanced Drug Delivery in Tumors. *Biomaterials* 269, 120620, 2020. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120620
- Chen, P. *et al.* Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs in vitro. *J. Antim. Chemother.* 58, 332–337, 2006. DOI: 10.1093/jac/dkl227
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- Cole, S. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544, 1998. DOI: 10.1038/31159
- da Silva, P.E.A., Palomino, J.C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and new drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1417–1430, 2011. DOI: 10.1093/jac/dkr173
- Drlica, K., Malik, M. Fluoroquinolones: Action and Resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 249–282, 2005. DOI: 10.2174/1568026033452537
- Feng, H. *et al.* Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cryptotanshinone. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. DOI: 10.1155/2009/617509
- Gao, H. *et al.* Simultaneous purification of dihydrotanshinone, tanshinone I, cryptotanshinone, and tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* and their anti-inflammatory activities investigation. *Sci. Rep.* 8, 1–13, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-26828-0
- Gao, Y. *et al.* Association between tuberculosis and COVID-19 severity and mortality: A rapid systematic review and meta-analysis. *J. Med. Virol.* 93, 194–196, 2021. DOI: 10.1002/jmv.26311

- Gong, Y. *et al.* Bioactive tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* inhibit the growth of prostate cancer cells in vitro and in mice. *Int. J. Cancer* 129, 1042–1052, 2011. DOI: 10.1002/ijc.25678
- Gordon, S. V., Parish, T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology* 24–26, 2018. DOI: 10.1099/mic.0.000601
- Guan, R. *et al.* Sodium tanshinone IIA sulfonate decreases cigarette smoke-induced inflammation and oxidative stress via blocking the activation of MAPK/HIF-1 α signaling pathway. *Front. Pharmacol.* 9, 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.00263
- Gutierrez, C., Somoskovi, A. Human Pathogenic *Mycobacteria*, Third Edit. ed, Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier, 2014. DOI: 10.1016/b978-0-12-801238-3.00137-9
- Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R., Quinn, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 111–129, 2015. DOI: 10.1038/nrd4510
- Heysell, S.K. *et al.* Sensititre MycoTB Plate Compared to Bactec MGIT 960 for First- and Second-Line Antituberculosis Drug Susceptibility Testing in Tanzania : a Call To Operationalize MICs 59, 7104–7108, 2015. DOI: 10.1128/AAC.01117-15.Address
- Honore, N., Cole, S.T. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 238–242, 1994. DOI: 10.1128/AAC.38.2.238
- Ignasiak, K., Maxwell, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res. Notes* 10, 1–8, 2017. DOI: 10.1186/s13104-017-2757-8
- Jnawali, H.N. *et al.* Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 975–982, 2013. DOI: 10.1007/s11274-013-1256-x
- Knasmüller, S. *et al.* Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 402, 185–202, 1998. DOI: 10.1016/S0027-5107(97)00297-2
- Lee, H.S., Kim, Y. Antifungal activity of *Salvia miltiorrhiza* against *Candida albicans* is associated with the alteration of membrane permeability and (1,3)- β -D-glucan synthase activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 610–617, 2016. DOI: 10.4014/jmb.1511.11009
- Li, H. *et al.* A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen. *Biomed. Pharmacother.* 137, 111332, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111332
- Liu, M. *et al.* Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods* 42, 325–329, 2007. DOI: 10.1016/j.ymeth.2007.02.013
- Liu, X. *et al.* Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 102, 447–461, 2012. DOI: 10.1007/s10482-012-9777-0

- Luo HW, Gao JW, Zheng JR. Relationship between structure and antibacterial activities of tanshinones and related compounds. *J Chin pharm Univ* 19:258–262, 1988.
- Nguyen, L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Arch. Toxicol.* 90, 1585–1604, 2016. DOI: 10.1007/s00204-016-1727-6
- Orme, I. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1943–1946, 2001. DOI: 10.1128/AAC.45.7.1943
- Palomino, J.C. *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2720–2722, 2002. DOI: 10.1128/AAC.46.8.2720
- Palomino, J.C., Martin, A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics* 3, 317–340, 2014. DOI: 10.3390/antibiotics3030317
- Pang, H. *et al.* Chemical analysis of the herbal medicine *salviae miltiorrhizae radix et rhizoma* (Danshen). *Molecules*, 2016. DOI: 10.3390/molecules21010051
- Pavan, F.R. *et al.* Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 1898–1905, 2010. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.01.028
- Pavan, F.R., Sato, D.N., Leite, C.Q.F. An Approach to the Search for New Drugs Against Tuberculosis. *Underst. Tuberc. - New Approaches to Fight. Against Drug Resist*, 2012. DOI: 10.5772/31618
- Portugal, B. Caracterização bioquímica, dinâmica molecular e propriedades imunomoduladoras da prolil oligopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis*. Orientador: Jaime M. de Santana. Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2014.
- Reid, M.J.A. *et al.* Building a tuberculosis-free world: The Lancet Commission on tuberculosis. *Lancet* 393, 1331–1384, 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30024-8
- Ribeiro, C.M. Perfil de resistência a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. Orientador: Fernando R. Pavan. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2018.
- Ryu, S.Y., Lee, C.O., Choi, S.U. In vitro cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.* 63, 339–342, 1997. DOI: 10.1055/s-2006-957696
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 3–6, 1944. DOI: 10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe
- Shang, Q., Xu, H., Huang, L. Tanshinone IIA: A promising natural cardioprotective agent. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2012. DOI: 10.1155/2012/716459
- Shi, M.J. *et al.* Preventive and therapeutic role of Tanshinone IIA in hepatology. *Biomed. Pharmacother.* 112,

- 108676, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108676
- Sieniawska, E. *et al.* Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* inhibit *Mycobacterium tuberculosis* via disruption of the cell envelope surface and oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* 104743, 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112405
- Stephanie, F., Saragih, M., Tambunan, U.S.F. Recent progress and challenges for drug-resistant tuberculosis treatment. *Pharmaceutics*, vol. 13, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13050592
- Takiff, H.E. *et al.* Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 773–780, 1994. DOI: 10.1128/AAC.38.4.773
- TB Alliance. Why new TB Drugs?. Antimicrobial Resistance. New York: TB Alliance, 2021. Disponível em: <https://www.tballiance.org/why-new-tb-drugs/antimicrobial-resistance>. Acessado em: 13/08/2021
- Titgemeyer, F. *et al.* A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 189, 5903–5915, 2007. DOI: 10.1128/JB.00257-07
- Tsai, C.J.Y., Loh, J.M.S., Proft, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7, 214–229, 2016. DOI: 10.1080/21505594.2015.1135289
- Wang, D. *et al.* A tanshinone I derivative enhances the activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Res. Microbiol.* 168, 46–54, 2017. DOI: 10.1016/j.resmic.2016.08.002
- Wang, X., Morris-Natschke, S.L., Lee, K.H. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Med. Res. Rev.* 27, 133–148, 2007. DOI: 10.1002/med.20077
- WHO, 2021. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis.
- WHO. Global tuberculosis report 2020.
- WHO. Global tuberculosis report 2019.
- WHO. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017.
- Wojda, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.* 24, 342–357, 2017. DOI: 10.1111/1744-7917.12325
- Xing, L. *et al.* Bioavailability and pharmacokinetic comparison of tanshinones between two formulations of *Salvia miltiorrhiza* in healthy volunteers. *Sci. Rep.* 7, 1–10, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02747-4
- Yang, Y. *et al.* Tanshinone IIA may alleviate rifampin-induced cholestasis by regulating the expression and function of NTCP. *Hum. Exp. Toxicol.* 2020. DOI: 10.1177/0960327120979030
- Zhao, J. *et al.* Diterpenoid tanshinones and phenolic acids from cultured hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activities. *Molecules* 16, 2259–2267, 2011. DOI: 10.3390/molecules16032259