



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

MARIANA CRISTINA SOLCIA

**“Estudo do perfil biológico do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) e
possíveis mecanismos de ação frente ao *Mycobacterium tuberculosis*”**

Araraquara
São Paulo - Brasil
2018

Mariana Cristina Solcia

“Estudo do perfil biológico do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) e possíveis mecanismos de ação 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
São Paulo - Brasil
2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Mario e Mara, que são meus maiores exemplos na vida. São eles que com sabedoria sempre ensinaram que tudo que eu for fazer, que eu faça da melhor forma possível e dê o melhor de mim!

Dedico esse trabalho também, aos que enfrentam a doença da tuberculose. Os estudos e pesquisas desenvolvidas são sinais de luta e esperança.

“E você aprende que, realmente, tudo pode suportar; que realmente é forte e que pode ir muito mais longe – mesmo após ter pensado não ser capaz. E que realmente a vida tem seu valor, e, você, o seu próprio e inquestionável valor perante a vida” (William Shakespeare).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que tornou tudo possível! Por Sua bondade e providência, por não me desamparar nos momentos difíceis e por ser minha maior fortaleza!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, que sempre dedicou tempo, paciência e disposição para tornar esse trabalho possível. Agradeço por todo conhecimento transmitido, pelos desafios propostos e por toda motivação. Foi de imenso valor ter sido sua aluna!

Aos meus colegas e amigos de laboratório que sempre me ajudaram. Aos amigos Patrícia, Débora, Júlia, Caio e Isabel pela amizade, dedicação e contribuição na realização desse trabalho. Conheci pessoas admiráveis e fiz amizades que levarei para a vida! Pessoas que tornaram o trabalho do dia-a-dia muito mais leve e prazeroso. Terei sempre muito orgulho por fazer parte de um grupo como este.

A minha família e aos meus amigos por todo apoio e por sempre acreditarem na minha capacidade! Deus me presenteou com pessoas incríveis para estarem ao meu lado.

Ao meu noivo, que sempre me motivou e compartilhou de todos os momentos e caminhos percorridos. Agradeço pela paciência e por fazer real o sentido da palavra “companheiro”.

Aos professores integrantes da banca, avaliadores da dissertação de defesa desse trabalho, Profa. Dra. Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli e Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, pela disponibilidade e aceite. O conhecimento e contribuição para esse projeto são de extrema importância.

Agradeço pela bolsa de Mestrado concedida para a realização desse trabalho: processo nº 2016/24633-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradeço o apoio financeiro recebido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Capítulo I

RESUMO

A tuberculose (TB) é considerada epidemia prevalente e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é a doença transmissível mais mortal do mundo. O surgimento de resistência às principais classes de agentes antimicrobianos, e a estimativa de que cerca de 2 bilhões de pessoas possuem o microrganismo em estado latente em todo o mundo são fatores que constituem uma séria ameaça à saúde pública e contribuem diretamente para a incidência da doença. A necessidade de desenvolver novos agentes ativos para combater a TB representa um grande desafio para o controle e tratamento da doença. Nesse trabalho, foi explorada a estratégia de reutilização do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II), $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, uma vez que possui a capacidade de perturbar o funcionamento de uma grande variedade de sistemas biológicos além de ser de fácil obtenção e baixo custo. O objetivo foi buscar novas aplicações dessa molécula, investigando seu potencial e possíveis mecanismos de ação contra o *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente causador da TB. Foi determinada a atividade de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente a cepas de *M. tuberculosis*, através do método de microdiluição em placa (REMA), onde o complexo apresentou satisfatória inibição de bacilos sensíveis em condições normais, sem perder sua atividade quando submetido a diferentes condições de meio de cultura; apresentou inibição de bactérias em estado latente pelo método de LORA e inibiu de forma ainda eficaz bactérias com perfis de resistência múltipla (MDR-TB) e extensivas (XDR-TB). Em ensaios intramacrofágicos, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi capaz de eliminar mais de 80% das micobactérias contidas no interior de macrófagos, perfil comparável ao fármaco rifampicina, de primeira linha do tratamento contra TB. O complexo exibe um excelente índice de seletividade, demonstrado em ensaios de citotoxicidade e espectro de atividade estreito, por não apresentar inibição frente a outros patógenos testados. Em ensaios utilizando plasmas de animais após aplicação de dose única oral em camundongos BALB/c, demonstrou estar biodisponível a partir de 2h após a administração. Com o intuito de investigar o possível mecanismo de ação, o ensaio com micobacteriófagos indicou uma forte relação do complexo em inibir síntese proteica bacteriana. Investigou-se também a capacidade do complexo em inibir a síntese de parede celular pela técnica de cromatografia em camada delgada e possível inibição de bombas de efluxo através do ensaio de acúmulo de brometo de etídio, vias pelas quais o complexo não demonstrou atividade. Além desses ensaios buscando desvendar o(s) alvo(s) de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, foi realizado o isolamento de bactérias resistentes ao complexo, a fim de futuramente, investigar-se um possível mutante através de sequenciamento genômico buscando o alvo de mutações presentes e relacionar com o sítio alvo do complexo em micobactérias. Determinou-se também que *M. tuberculosis* apresenta baixa frequência de mutações frente ao complexo. Com os resultados obtidos até o momento, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ se mostra bastante promissor nos estudos, por apresentar atividades em diferentes formas da doença, como estado latente e intracelularmente em macrófagos. Além disso, é ativo em bactérias resistentes aos antimicrobianos existentes no tratamento da TB, atendendo dessa forma, a declaração da OMS em priorizar pesquisa e desenvolvimento direcionados ao *M. tuberculosis*, principalmente devido aos índices de resistência.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II), reutilização de moléculas.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is considered a prevalent epidemic and according to the World Health Organization (WHO) is the deadliest transmissible disease in the world. The emergence of resistance to the major classes of antimicrobial agents and the estimation that around 2 billion people have the microorganism latent throughout the world are factors that constitute a serious threat to public health and contribute directly to the incidence of the disease. The need to develop new active agents to combat TB poses a major challenge for the control and treatment of TB. In this work, the reuse strategy of the *tris*-(1,10-phenanthroline)iron(II) complex, $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, was explored, since it has the ability to disturb the functioning of a large variety of biological systems besides being easy to obtain and low cost. The objective was to search for new applications of this molecule, investigating its potential and possible mechanisms of action against *Mycobacterium tuberculosis*, the main agent causing TB. The activity of $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ against *M. tuberculosis* strains was determined by the plaque microdilution method (REMA), where the complex showed satisfactory inhibition of sensitive bacilli under normal conditions, without losing its activity when submitted to different culture medium conditions; showed inhibition of latent bacteria by the LORA method and effectively inhibited strains with multiple resistance profiles (MDR-TB) and extensive (XDR-TB) profiles. In intramacrophagic assays, $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ was able to eliminate more than 80% of the mycobacteria contained within macrophages, a profile comparable to the drug rifampicin, the first-line treatment for TB. The complex exhibits an excellent selectivity index, demonstrated in cytotoxicity and narrow activity spectra, as it does not present inhibition against other pathogens tested. In animal plasma assays after single oral dose application in BALB/c mice, it has been shown to be bioavailable from 2h after administration. In order to investigate the possible mechanism of action, the mycobacteriophage assay indicated a strong relationship of the complex in inhibiting bacterial protein synthesis. The ability of the complex to inhibit cell wall synthesis by the thin layer chromatography technique and possible inhibition of efflux pumps was also investigated by the ethidium bromide accumulation assay, in which the complex showed no activity. In addition to these assays in order to unravel the target(s) of $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, the isolation of complex resistant bacteria was carried out in order to further investigate a possible mutant through genomic sequencing searching for the target of mutations present and relate to the target site of the complex in mycobacteria. It was also determined that *M. tuberculosis* presents a low frequency of mutations to the complex. With the results obtained, $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ shows to be very promising in the studies, since it presents activities in different forms of the disease, as latent and intracellularly in macrophages. In addition, it is active in antimicrobial resistant bacteria that exist in the treatment of TB, thus complying with the WHO declaration to prioritize research and development aimed at *M. tuberculosis*, mainly due to resistance indexes.

Key-words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *tris*-(1,10-phenanthroline)iron(II), reuse of molecules.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABM – albumina

ADC – Albumina, Dextrose e Catalase

Ag – prata

AIDS – *Acquired Immune Deficiency Syndrome*

ATP – adenosina trifosfato

Bipi – bipyridina

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

C_{máx} – concentração plasmática máxima

Co – cobalto

Cu – cobre

DHR – 1,2,3-diidrorodamina

DL – Dose Letal

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

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – *deoxyribonucleic acid*

Doxo – doxorubicina

EDTA - Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMB – etambutol

ETA – etionamida

EtBr - brometo de etídio

Fe – ferro

Fen – fenantrolina

([Fe(fen)₃]²⁺) – complexo metálico 1-10-fenantrolina com ferro (II)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

IC – Índice de Citotoxicidade

IL – interleucina

ILT_B – Infecção Latente da Tuberculose

INH – isoniazida

IS – Índice de Seletividade

LB – meio de cultura Luria-Bertani

LORA – *Low Oxygen Recovery Assay*

mAGP – complexo micolil-arabino-galactano-peptídeoglicano

MDR-TB – bactéria resistente a múltiplos fármacos

Mn – manganês

MN – micronúcleo

MOI – *Multiplicity of Infection*

M. smegmatis – *Mycobacterium smegmatis*

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

MOXI – moxifloxacino

NED – N-(1-naftil) etilenodiamina

NO – *Nitric Oxide*

OADC – ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OMS – Organização Mundial de Saúde

Os – ósmio

PBS – tampão fosfato-salino

PEG – polietilenoglicol

PSR – Persistente Sem Replicação

PZA – pirazinamida

REMA – *Resazurin Microtiter Assay*

Rf – fator de retenção

RFP – rifampicina

Rpm – rotação por minuto

RNA – *ribonucleic acid*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*

Ru – rutênio

SFB – Soro Fetal Bovino

STR – estreptomicina

TB – tuberculose

TB-MDR – tuberculose resistente a múltiplos fármacos

TB-XDR – tuberculose extensivamente resistente aos fármacos

TB-TDR – tuberculose totalmente resistente aos fármacos

TGF- β – *Transforming growth factor-beta*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFP – Unidade Formadora de Placa

UNESP – Universidade Estadual Paulista

URL – Unidade Relativa de Luminescência

XDR-TB – bactéria extensivamente resistente aos fármacos

Zn – zinco

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Fármacos utilizados no tratamento da TB; Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀); genes responsáveis pela resistência e mecanismos de ação desses antimicrobianos frente ao *M. tuberculosis*.....pág. 22
- Tabela 2** – Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas sensíveis de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em estado metabólico ativo (REMA) e em estado de latência (LORA).....pág. 44
- Tabela 3** – Resultados da determinação de índice de citotoxicidade (IC₅₀) do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) frente a linhagens celulares J774A.1 (ATCC TIB-67), macrófagos de murinos e MRC-5 (ATCC CCL-171), fibroblastos humanos de pulmão em diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72h); e células HepG2 (ATCC HB-8065), hepatocarcinoma humano, em 24h.....pág. 46
- Tabela 4** – Resultados da determinação do Índice de Seletividade (IS) do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) utilizando a razão (IC₅₀/CIM₉₀)pág. 47
- Tabela 5** – Resultados da atividade do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) frente diferentes cepas bacterianas Gram-positivas e negativas, cálculo da concentração inibitória de 90% (CIM₉₀). Valores apresentados como média (M) ± desvio padrão (DP) de três ensaios independentes.....pág. 50
- Tabela 6** – Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de resistências aos antimicrobianos utilizados no tratamento da TB.....pág. 51
- Tabela 7** – Resultado de Biodisponibilidade do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺), demonstrado por níveis de concentração plasmática em diferentes tempos após administração oral única (300 mg/kg/corpo) em camundongos BALB/c.....pág. 59
- Tabela 8** – Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas de *M. smegmatis* mc²155.....pág. 68
- Tabela 9** – Quantidade de UFC encontradas em concentrações iguais ou superiores ao CIM₉₉.....pág. 73
- Tabela 10** – Isolamento de *M. tuberculosis* com crescimento na concentração de 3,0 µg/mL em meio sólido 7H11.....pág. 73
- Tabela 11** – Isolamento de *M. tuberculosis* com crescimento na concentração de 2,6 µg/mL em meio sólido 7H11.....pág. 74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxas estimadas de incidência de TB em 2017.....	pág. 14
Figura 2 – Etapas de transmissão e patogênese da TB.....	pág. 16
Figura 3 – Estruturas químicas dos fármacos de primeira linha do tratamento da TB.....	pág. 20
Figura 4 – Estrutura química de 1,10-fenantrolina.....	pág. 25
Figura 5 – Ilustração da reação de formação do complexo de Fe^{2+} com a 1,10-fenantrolina	pág. 28
Figura 6 – Estrutura química de <i>tris</i> -(1,10-fenantrolina)ferro(II) - $([\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+})$	pág. 28
Figura 7 – Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) do complexo $([\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+})$ em diferentes condições do meio de cultura.....	pág. 49
Figura 8 – Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) do fármaco RFP em diferentes condições do meio de cultura.....	pág. 49
Figura 9 – Atividade Intramacrofágica.....	pág. 53
Figura 10 – Quantificação da produção de TGF- β em ensaios intramacrofágicos.....	pág. 55
Figura 11 – Quantificação da produção de NO em ensaios intramacrofágicos.....	pág. 56
Figura 12 – Quantificação da produção de H_2O_2 em ensaios intramacrofágicos.....	pág. 57
Figura 13 – Curva de Biodisponibilidade.....	pág. 60
Figura 14 – Procedimento de ensaio com dose inicial de 2.000 mg/Kg de peso corpóreo.....	pág. 61
Figura 15 – Taxa de sobrevivência em ensaio de toxicidade aguda.....	pág. 62
Figura 16 – Peso de órgãos de camundongos BALB/c.....	pág. 63
Figura 17 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	pág. 64
Figura 18 – Resultado do ensaio de acúmulo de BrEt.....	pág. 66
Figura 19 – Placa de meio de cultura sólido com Unidades Formadores de Placas.....	pág. 69
Figura 20 – Investigação da inibição de síntese proteica micobacteriana	pág. 70
Figuras 21 e 22 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₉) de $([\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+})$ frente <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv em meio sólido.....	pág. 72
Figura 23 – Célula binucleada com micronúcleo.....	pág. 76
Figura 24 – Avaliação da mutagenicidade através de ensaios de micronúcleo <i>in vitro</i>	pág. 77

SUMÁRIO

Capítulo I	5
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 A Tuberculose	14
1.2 Mecanismos de transmissão e patogênese	15
1.3 Tuberculose latente	18
1.4 O tratamento da TB e o desafio da resistência aos antimicrobianos.....	19
1.5 A busca de novos fármacos anti-TB	23
1.6 Complexos Metálicos e <i>tris</i> -(1,10-fenantrolina)ferro(II).....	24
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Complexo <i>tris</i> -(1,10-fenantrolina)ferro(II) e cepas bacterianas	31
3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) frente ao <i>M. tuberculosis</i> em estado metabólico ativo	31
3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) frente o <i>M. tuberculosis</i> em estado de latência.	32
3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina e 10% de soro fetal bovino)	33
3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) frente isolados clínicos com perfis de resistência aos antimicrobianos.....	33
3.6 Determinação do índice de citotoxicidade (IC ₅₀) frente a linhagens celulares de macrófagos (J774A.1), fibroblastos (MRC-5) e hepatócitos (HepG2).....	33
3.7 Determinação do índice de seletividade (IS)	34
3.8 Determinação da atividade intramacrofágica e atividade imunomoduladora.....	34
3.9 Espectro de Atividade	35
3.10 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₉) frente a <i>M. tuberculosis</i> em meio sólido	36
3.10.1 Isolamento e determinação da frequência das cepas resistentes de <i>M. tuberculosis</i>	37
3.11 Ensaio presuntivo de mecanismo de ação relacionado à maquinaria de transcrição e tradução bacteriana	37
3.11.1 Produção de estoque de micobacteriófagos	37
3.11.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) frente ao <i>M. smegmatis</i>	38

3.11.3 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de proteínas..	38
3.12 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de parede celular	39
3.13 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a inibição de bomba de efluxo	40
3.14 Avaliação do potencial mutagênico utilizando a técnica de micronúcleo <i>in vitro</i>	41
3.15 Avaliação da biodisponibilidade oral.....	41
3.16 Determinação da toxicidade aguda	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em estado metabólico ativo e não-replicante	44
4.2 Determinação do Índice de Citotoxicidade frente a linhagens celulares HepG2, J774A.1 e MRC-5	45
4.3 Determinação do Índice de Seletividade (IS)	47
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em estado metabólico ativo submetido a diferentes condições	48
4.5 Avaliação do espectro de atividade	50
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀) frente isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> com diferentes perfis de resistência	51
4.7 Determinação da atividade intramacrofágica e imunomoduladora	53
4.7.1 Atividade intramacrofágica	53
4.7.2 Atividade imunomoduladora.....	54
4.9 Avaliação da toxicidade aguda	60
4.10 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de parede celular	63
4.11 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a inibição de bomba de efluxo	65
4.12 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de proteínas	67
4.13 Seleção e isolamento das cepas resistentes de <i>M. tuberculosis</i>	71
4.14 Avaliação do potencial mutagênico	76
5. CONCLUSÃO.....	78
6. REFERÊNCIAS	79
Capítulo II.....	90

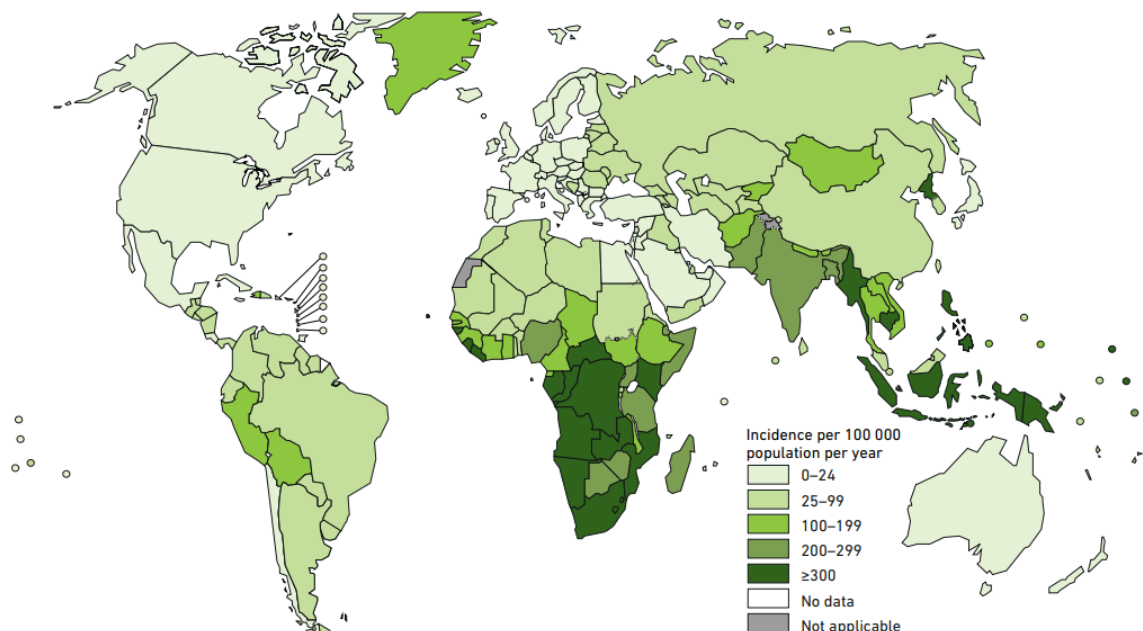
1. INTRODUÇÃO

1.1 A Tuberculose

A tuberculose (TB) existe há milênios e continua a ser um grande problema de saúde global, deixando milhões de pessoas doentes a cada ano. A doença ocupa um lugar entre as dez principais causas de morte em todo o mundo. Nos últimos 5 anos, tem sido a principal causa de morte por um único agente infeccioso, acima da AIDS/ HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Apesar de mais de duas décadas de esforços para encontrar e tratar fontes infecciosas da doença, cerca de 10,0 milhões de casos de TB incidentes com 1,3 milhões de óbitos ocorreram em 2017 no mundo todo (Figura 1). Portanto, mundialmente, o “fim” da TB como uma epidemia e problemática na saúde pública ainda continua sendo uma aspiração e não uma realidade (LEUNG; CHEE; ZHANG, 2017; WHO, 2018).

Figura 1 – Taxas estimadas de incidência de TB em 2017



Fonte: WHO (2018).

O principal patógeno causador da TB é o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), descrito pela primeira vez por Robert Koch em 1882. Nessa época, nos Estados Unidos e na

Europa, a TB matou uma em cada sete pessoas. Depois de um século da descoberta do Dr. Koch, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a União Internacional declararam o primeiro dia Mundial da TB em 24 de março 1982 (VASAVA et al., 2017; GORDON; PARISH, 2018).

M. tuberculosis é um bacilo aeróbico, tendo como característica definidora uma taxa de crescimento lento, com um tempo de divisão de cerca de 24 horas. É visualizado por microscopia óptica através da coloração de *Ziehl-Neelsen*, por meio da qual sua parede celular espessa e cerosa retém a coloração de carbolfucsina frente a lavagens ácido-álcool. Essa parede é característica das micobactérias, embora fossem classificadas como Gram-positivas, possuem uma estrutura semelhante a das bactérias Gram-negativas com uma segunda "membrana externa" que contém os ácidos micólicos - ácidos graxos ramificados de cadeia longa. A camada externa da membrana citoplasmática forma um complexo maior, com o núcleo compreendendo peptidoglicano ligado ao arabinogalactano, por sua vez ligado aos ácidos micólicos, conhecido como complexo micolil-arabino-galactano-peptídeo-glicano (mAGP). *M. tuberculosis* é um agente patogênico intracelular, capaz de parasitar fagócitos mononucleares humanos, passando a maior parte do seu ciclo de vida em macrófagos (VASAVA et al., 2017; GORDON; PARISH, 2018).

1.2 Mecanismos de transmissão e patogênese

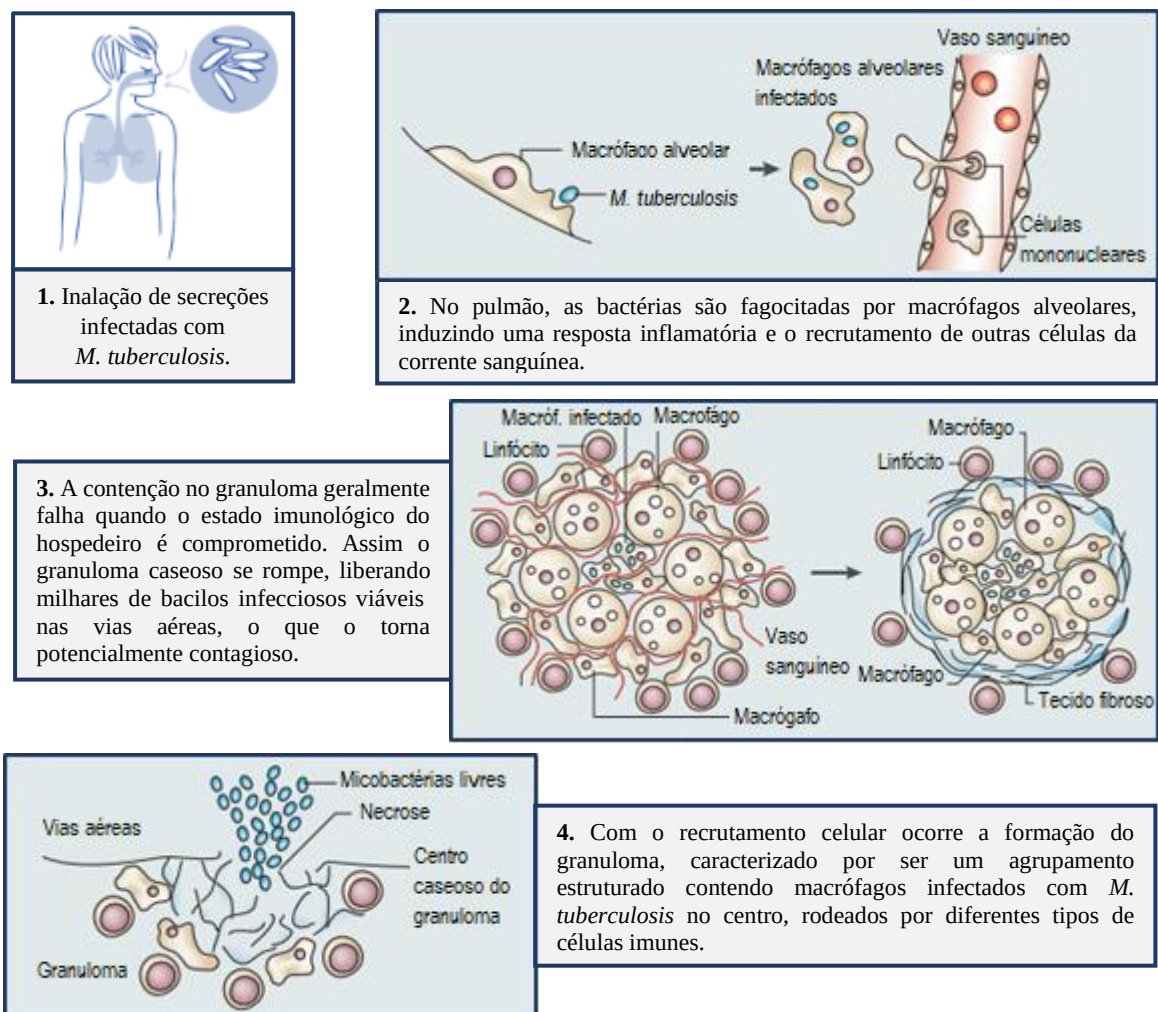
A TB afeta os pulmões em mais de 80% dos casos (TB pulmonar), mas também pode afetar outros locais (TB extrapulmonar) se espalhando através da extensão linfática, hematogênica ou direta de um foco infeccioso (ANKRAH et al., 2017). A doença é transmitida quando pessoas que estão doentes com TB pulmonar ativa expulsam secreções infectadas com *M. tuberculosis* das vias respiratórias, por exemplo, tossindo, e então o bacilo é inalado por hospedeiros susceptíveis (WHO, 2016; CHIN et al., 2017). A figura 2, a seguir, demonstra esquematicamente de forma resumida e simplificada, as etapas de transmissão e patogênese da TB. Como em muitas outras doenças infecciosas, a transmissão da TB não é uniforme, e a resposta à infecção difere para cada indivíduo. Em particular, pessoas com uma forma da TB chamada tuberculose cavitária são especialmente 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; VERRECK, 2012).

Após a inalação de bactérias, o microrganismo pode ser completamente eliminado pelo

sistema imunológico, pode ser contido em estado quiescente, ou dar origem a uma infecção ativa. O resultado depende do estado imunológico do hospedeiro e pode ocasionar um espectro de estados de TB sem infecção, latente através da doença subclínica e a doença ativa declarada (ANKRAH et al., 2017).

Em pacientes sem exposição prévia ao *M. tuberculosis*, os receptores de reconhecimento de padrões expressos por macrófagos, células dendríticas e células epiteliais alveolares interagem com ligantes presentes nas micobactérias. Isso resulta na produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas induzindo uma resposta inflamatória local e a migração de monócitos da corrente sanguínea para o local de infecção (RUSSELL, 2007; ANKRAH et al., 2017).

Figura 2 - Etapas de transmissão e patogênese da TB



Fonte: Ilustração adaptada de RUSSEL (2006).

O objetivo da imunidade celular inata é a destruição do agente patogênico através da formação do fagossoma, ou seja, em organelas celulares em que ocorre a degradação enzimática do material fagocitado. O processo necessário de maturação fagossômica requer fusão com o lisossoma, acidificação do fagossoma por bombeamento de prótons e ativação de hidrolases lisossômicas. *M. tuberculosis* pode bloquear este processo e, assim, escapar de forma eficaz, de um ataque pela imunidade inata (WELIN et al., 2011; HERZMANN et al., 2017). *M. tuberculosis* tem a capacidade notável de sobreviver dentro do ambiente hostil do macrófago (PIETERS, 2008). Os bacilos intracelulares, geralmente, são mais difíceis para tratar devido ao acesso limitado de determinados fármacos às células macrofágicas, necessitando de tratamento crônico com altas doses terapêuticas para controle efetivo e tratamento da doença (SCHWARTZ et al., 2006).

A resposta imune adaptativa geralmente ocorre após aproximadamente 4-6 semanas em humanos, após a apresentação de antígenos de *M. tuberculosis* por células dendríticas a linfócitos T nos linfonodos, promovendo a migração dessas células para o local da infecção, induzindo a formação de um granuloma. Os granulomas são agrupamentos estruturados contendo macrófagos infectados com *M. tuberculosis* no centro, rodeados por diferentes tipos de células imunes, em particular macrófagos e linfócitos T (PIETERS, 2008; ANKRAH et al., 2017). A formação desse granuloma é um mecanismo do sistema imune adaptativo em oferecer proteção ao hospedeiro contra a infecção, dificultando que os bacilos de *M. tuberculosis* se espalhem para outros tecidos (ANKRAH et al., 2017).

Em um único paciente, as estruturas de granuloma são heterogêneas e podem ser celulares e bem vascularizadas, necróticas com bactérias extracelulares residindo em um núcleo de *caseum* rico em lipídios ou então do tipo cavitário, no qual o granuloma se funde com uma via aérea. Em muitos casos, a estrutura do granuloma restringe o fluxo sanguíneo e a difusão de fármacos em seu centro (WELLINGTON; HUNG, 2018). Os granulomas transmissivos possuem abundantes neutrófilos e a necrose predomina e permite reativação, crescimento e disseminação de *M. tuberculosis* para outras partes do corpo (ANKRAH et al., 2017).

Os vários nichos que o *M. tuberculosis* ocupa, incluindo o interior dos macrófagos e no *caseum* dos granulomas, são caracterizados por hipóxia, privação de nutrientes, nitrogênio reativo, espécies de oxigênio e pH ácido (WELLINGTON; HUNG, 2018).

Os granulomas podem persistir durante anos e conter eficientemente o patógeno enquanto o indivíduo se mantiver imunocompetente. Geralmente, 90% dos indivíduos que entram em contato com os bacilos de *M. tuberculosis* controlam a infecção, de forma

assintomática, contendo essas bactérias num estado dormente no interior do granuloma, conhecido como infecção latente da tuberculose (ILTb). Nos casos de ILTB, a estrutura do granuloma provavelmente representa um equilíbrio entre um patógeno potencialmente perigoso e o sistema imune do hospedeiro. A delicadeza deste equilíbrio é ilustrada pela observação de que qualquer deterioração da imunidade do hospedeiro resulta em uma condição potencialmente fatal de um indivíduo que possui *M. tuberculosis* em latência (BARTLETT, 2007; PIETERS, 2008). Enquanto a imunidade do hospedeiro (na forma de macrófagos ativados e células T funcionais) é efetiva, geralmente não há efeito adverso do *M. tuberculosis* na saúde do hospedeiro (SAUNDERS; BRITTON, 2007).

1.3 Tuberculose latente

Cerca de 90% dos pacientes infectados podem normalmente responder à infecção por *M. tuberculosis* por formação de granulomas e estabelecimento de TB latente, durante a qual os bacilos de *M. tuberculosis* persistem no hospedeiro em um estado de hipóxia, metabolicamente inativos ou de reprodução lenta (GORDON; PARISH, 2018).

É estimado que cerca de 23% da população mundial, aproximadamente 1,7 bilhões de indivíduos apresentem essa forma de infecção ILTB, na qual abrigam bacilos não infecciosos, definida pela OMS como estado de resposta imune persistente à estimulação por antígenos de *M. tuberculosis* sem evidência de TB ativa clinicamente manifestada (ANKRAH et al., 2017; WHO, 2018).

Para a maioria dos casos ILTB, o *M. tuberculosis* permanece latente por muitos anos ou até durante toda a vida do hospedeiro (TANG; JOHNSTON, 2017). No entanto, se o sistema imune hospedeiro não puder conter as micobactérias, o microrganismo terá a oportunidade de progredir para uma infecção ativa e sintomática. Aproximadamente 5-15% dos indivíduos com TB latente desenvolverão a doença ativa, principalmente quando expostos a perturbações imunes profundas, como durante um tratamento com fármacos imunossupressores, em doenças como o diabetes associado a deficiência imune e especialmente indivíduos coinfectados com HIV, sendo essa associação uma das principais causas de morte em indivíduos doentes (LEÓN-DÍAZ et al., 2010; TANG; JOHNSTON, 2017; TOUSIF et al., 2017).

Em 2015, cerca de 35% dos pacientes infectados pelo HIV morreram devido a coinfeção com TB. Os indivíduos soropositivos para o HIV e infectados pelo *M. tuberculosis* apresentam de 21 a 34 vezes mais chance de desenvolver a doença ativa comparados aos

soronegativos para o HIV. Esses indivíduos imunocomprometidos desenvolvem TB ativa devido à falha de seu sistema imunológico em controlar ou erradicar a infecção (CAILLEAUX-CEZAR, 2012; WALKER, 2013; WHO, 2016).

Quando ocorre a reativação da doença, ou seja, bacilos em estado latente se tornam infecciosos, o granuloma perde a sua estrutura deixando de conter as bactérias viáveis, o que conduz à sua replicação e à disseminação da doença. Nestes casos, o sistema imune é incapaz de conter a infecção, o centro caseoso liquidifica, levando à formação de uma cavidade (RUSSELL, 2007). Os macrófagos não sobrevivem nestas lesões, sendo ineficazes no controle da multiplicação das bactérias, agora também com uma localização extracelular. Nesta fase, o bacilo pode atingir números muito elevados, sendo bem conhecido o elevado risco de contágio na TB pulmonar cavitária (MIRANDA et al., 2012). Este processo pode resultar na libertação de bactérias viáveis para a corrente sanguínea, originando focos de infecção à distância em vários órgãos, ou as bactérias podem ser libertadas para as vias aéreas onde podem ser expulsas dos pulmões e infectar outros indivíduos. Portanto, a transmissão de TB para a comunidade ocorre no ciclo repetitivo interminável de contato, infecção e desenvolvimento de doença ativa (KIM; KIM, 2018).

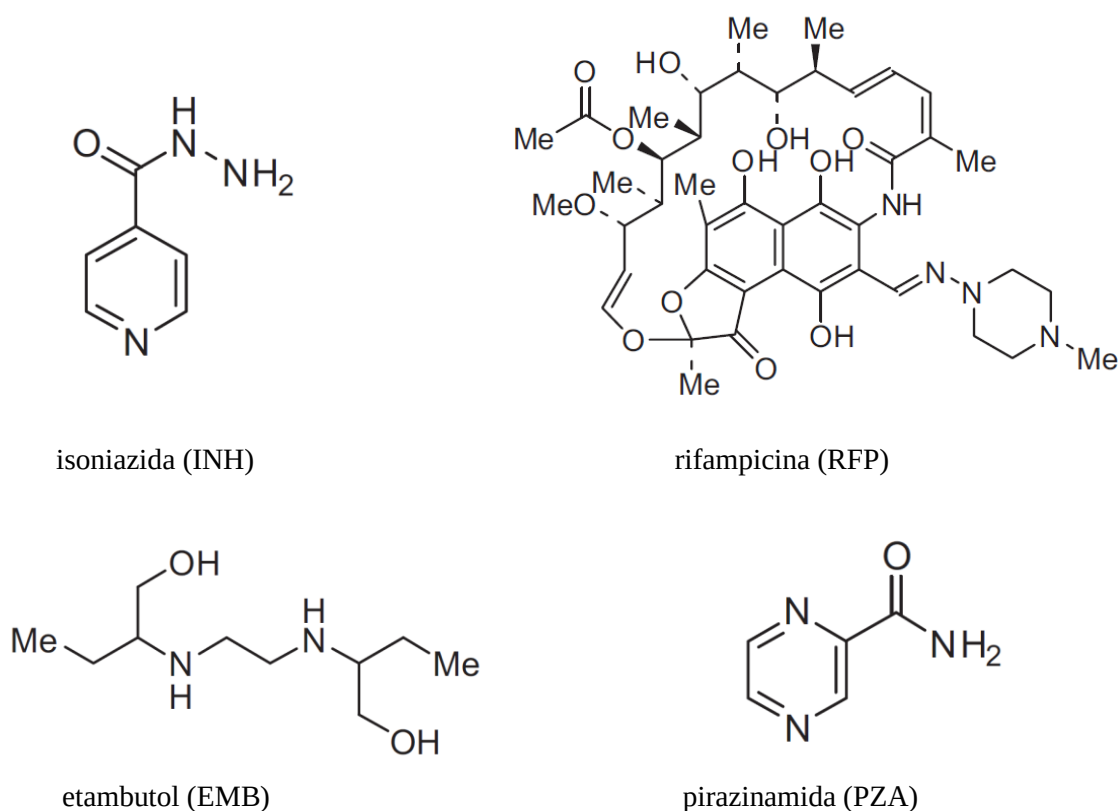
Embora a maior parte dos indivíduos infectados por ILTB permaneçam assintomáticos, eles servem como o reservatório global para o agente patogênico, tornando o controle desta doença um desafio ainda mais significativo (RUSSELL, 2007; TOUSIF et al., 2017). Existe a hipótese também, que *in vivo*, as subpopulações de bacilos não replicantes contribuem para o longo tempo necessário para tratamento da TB, o qual pode contribuir para o surgimento de bactérias resistentes a medicamentos (WELLINGTON; HUNG, 2018). Portanto, se a quimioprevenção efetiva é dada a indivíduos com ILTB, o risco de desenvolver TB ativa é significativamente reduzido, podendo contribuir também na redução de tempo de tratamento e seleção de bactérias resistentes (TANG; JOHNSTON, 2017).

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

O tratamento com fármacos efetivos contra a TB foi desenvolvido pela primeira vez na década de 1940, com a descoberta da estreptomicina em 1943. O advento dos antibióticos para o tratamento da TB representou um grande avanço na luta contra a doença (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014; WHO, 2016).

Atualmente, o tratamento recomendado para novos casos de TB susceptível aos fármacos é um regime de 6 meses, utilizando quatro medicamentos de primeira linha: isoniazida (INH), rifampicina (RFP), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), cujas estruturas químicas são apresentadas na figura 3 (CHAUDHARI et al., 2016; WHO, 2016). Uma combinação de antibióticos é recomendada para evitar a seleção de mutantes resistentes. No entanto, apesar do estabelecimento precoce de terapias de combinação de fármacos no tratamento da doença, as cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos continuaram a evoluir (CITRON; ANGEL; CAMPBELL, 1976; GYGLI et al., 2017; MAITRE et al., 2017).

Figura 3 – Estruturas químicas dos quatro fármacos de primeira linha do tratamento da TB



Fonte: BRENNAN et al. (2008).

No tratamento de TB resistente a medicamentos, os pacientes são submetidos a terapias com antimicrobianos por 9 meses a dois anos ou mais, durante o qual são administrados mais de 10 mil comprimidos, além de injeções diárias, por pelo menos 6 meses. Além disso, os regimes de tratamento nos casos de resistência são menos efetivos e menos acessíveis do que os regimes de primeira linha, mais onerosos, tóxicos e complicados de serem entregues (ZIGNOL et al., 2016). Daqueles que são capazes de acessar o tratamento, apenas 55% dos

pacientes com TB multirresistente (MDR-TB) e 34% dos pacientes com TB extensivamente resistente aos fármacos (XDR-TB) são curados (WHO, 2018; WELLINGTON; HUNG, 2018).

A tuberculose resistente a múltiplos fármacos (TB-MDR) é definida como uma forma da doença causada por bactérias que são resistentes ao tratamento com pelo menos dois dos medicamentos anti-TB de primeira linha mais poderosos, a isoniazida e rifampicina. (WHO, 2014; CHAUDHARI et al., 2016). A tuberculose extensivamente resistente aos fármacos (TB-XDR) é definida como TB causada por uma bactéria resistente a múltiplos fármacos (MDR), ou seja, resistente a pelo menos rifampicina e isoniazida, que também é resistente a qualquer fluoroquinolona e qualquer um dos medicamentos injetáveis de segunda linha, como capreomicina, canamicina ou amicacina. O termo "totalmente resistente aos fármacos" (TB-TDR) foi proposto para definir casos de tuberculose com resistência além da TB-XDR, na qual as micobactérias são praticamente resistentes a todos os medicamentos disponíveis de primeira e segunda linha do tratamento (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014).

A administração inadequada dos fármacos durante o tratamento pode resultar em resistência a medicamentos, falha no tratamento ou até mesmo morte. Devido ao longo período de tratamento, quando os pacientes estão assintomáticos, geralmente abandonam a terapia, pois não sentem a necessidade de continuarem submetidos ao tratamento. A hepatotoxicidade prolongada, causada pela associação dos antibióticos, é outro fator que contribui para a cessação do tratamento pelos pacientes. Essa interrupção, impede a depuração total dos bacilos de *M. tuberculosis* do organismo dos pacientes, representando substanciais riscos para a geração de organismos micobacterianos resistentes (CHAUDHARI et al., 2016; TOUSIF et al., 2017).

Em todo o mundo, a incidência da TB está caindo em cerca de 2% ao ano, porém, a doença ainda permanece como uma das 10 maiores causas de morte em todo o mundo. Os altos índices da doença estão relacionados principalmente com o desenvolvimento da resistência das bactérias aos medicamentos, que aumentam profundamente os desafios para erradicar a TB mundial (WHO, 2016; ABDELRAHMAN et al., 2017).

Essa crescente incidência de resistência a medicamentos gera cada vez mais preocupações com o tratamento da doença, constituindo uma séria ameaça à saúde pública. Segundo dados publicados pela OMS, em 2016 existiram 580.000 novos casos de TB-MDR. Destes, cerca de 250.000 (160.000 a 340.000) pacientes morreram, tornando a TB-MDR a doença mais comum e mortal causada pela resistência antimicrobiana em todo o mundo (WHO, 2016, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Muitos casos de TB-XDR são considerados praticamente intratáveis, dependendo do nível de resistência aos medicamentos de segunda linha, além disso, as condições inerentes à imunidade do paciente podem contribuir para as altas taxas de morbidade e mortalidade associadas com a resistência (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014; ABDELRAHMAN et al., 2017).

Os resultados do tratamento para pacientes com TB múltipla e extensivamente resistente a medicamentos (TB-MDR/ XDR) permaneceram estáticos por muitos anos, apesar das melhorias na cobertura do tratamento e disponibilidade de mais eficazes (fluoroquinolonas de geração posterior) ou novos medicamentos (bedaquilinos e delamanídeos) (WHO, 2017).

Há duas maneiras pelas quais os indivíduos contraem TB resistente a fármacos. A resistência primária resulta da infecção por uma cepa resistente ao fármaco, enquanto a resistência que se desenvolve durante a terapia é referida como resistência secundária ou adquirida (DHEDA et al., 2017).

O principal veículo que conduz a resistência a fármacos em *M. tuberculosis* é a aquisição de mutações em genes específicos que codificam os alvos dos fármacos ou enzimas ativadoras de fármacos. Outros fatores atribuídos à resistência do bacilo é a característica de sua parede celular em ser altamente hidrofóbica, podendo dificultar a atividade de alguns fármacos, e ainda, a ação de bombas de efluxo, que fornecem um meio para o microrganismo escapar das terapias antimicrobianas (GREEN; GARNEAU-TSODIKOVA, 2013; DOOKIE et al., 2018).

Os avanços na tecnologia de sequenciamento do genoma de *M. tuberculosis* aumentaram significativamente a compreensão dos mecanismos de resistência a medicamentos antituberculosos, além de direcionar os mecanismos pelos quais o fármaco atua na eliminação do bacilo (DOOKIE et al., 2018). A tabela 1 ilustra mecanismos de resistência frente a alguns antimicrobianos utilizados na terapia da TB.

Tabela 1 - Fármacos utilizados no tratamento da TB; intervalo considerável de Concentração Inibitória Mínima (CIM); genes responsáveis pela resistência e mecanismos de ação desses antimicrobianos frente ao *M. tuberculosis*.

Antimicrobiano	CIM (mg/L)	Gene	Função do produto do gene	Função	Mecanismo de ação
rifampicina	0.05-0.1	<i>rpoB</i>	Subunidade β da RNA polimerase	Fármaco alvo	Inibição da síntese de RNA

Antimicrobiano	CIM (mg/L)	Gene	Produto do gene	Função	Mecanismo de ação
isoniazida	0.02-0.2	<i>KatG</i>	catalase/peroxidase	Conversão de pró-fármaco	Inibição da biossíntese de ácidos micólicos e múltiplos efeitos
		<i>inhA</i>	Enoil redutase	Fármaco alvo	
		<i>ahpC</i>	Alquilo hidropéroxido redutase	Fármaco alvo	
pirazinamida	16-50 (pH 5.5)	<i>pncA</i>	PZase	Conversão de pró-fármaco	Alteração do potencial de membrana
		<i>RpsA*</i>	Proteína ribossomal S1	Fármaco alvo	Inibição da síntese proteica
estreptomicina	2-8	<i>rpsL</i>	Proteína ribossomal S12	Fármaco alvo	Inibição da síntese proteica
		<i>rrs</i>	16S rRNA	Fármaco alvo	
		<i>gidB</i>	7-metilguanosina methyltransferase	Fármaco alvo	
etambutol	1-5	<i>embB</i>	Arabinosil transferase	Fármaco alvo	Inibição da síntese de arabinoglicano
fluoroquinolonas	0.5-2.0	<i>gyrA/gyrB</i>	DNA girase	Fármaco alvo	Inibição da DNA girase
canamicina/amicacina	2-4	<i>rrs</i>	16S rRNA	Fármaco alvo	Inibição da síntese proteica
capreomicina/viomicina	2-4	<i>tlyA</i>	Rna methyltransferase	Fármaco alvo	Alteração da síntese proteica
ethionamida	10	<i>inhA</i>	Enoil redutase	Fármaco alvo	Inibição da síntese de ácidos micólicos
bedaquilina	0.03	<i>atpE</i>	ATP sintase	Produção de ATP	Inibição da unidade C da ATP sintase

Fonte: DA SILVA; PALOMINO (2011).

1.5 A busca de novos fármacos anti-TB

Diante do atual cenário representado pela TB como a doença infecciosa que mais mata pessoas anualmente, a OMS divulgou um relatório em 2017 destacando o *M. tuberculosis* como um patógeno prioritário para a pesquisa e desenvolvimento contínuo de novos antibióticos (HOUBEN; DODD, 2016; WHO, 2017).

Os quatro principais fármacos existentes eficazes para a TB (INH, RFP, PZA e EMB) foram introduzidos há mais 50 anos (VASAVA et al., 2017). Existe, portanto, uma necessidade urgente de desenvolver agentes anti-tuberculosos mais novos, potentes e seguros que possuam um novo mecanismo de ação sendo capazes de inibir bacilos resistentes aos fármacos e que sejam potencialmente efetivos em bactérias intracelulares e não replicantes, ajudando a encurtar o atual tratamento da TB (VASAVA et al., 2017; WELLINGTON; HUNG, 2018).

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos constituem um processo lento e oneroso. Duas abordagens principais para a investigação de um novo medicamento anti-TB são

consideradas atualmente, uma delas é baseada na síntese de análogos de medicamentos, com o objetivo de encurtar e melhorar o tratamento da TB, a outra baseia-se na busca de novas estruturas nunca antes investigadas frente micobactérias (PAVAN et al., 2011). Uma outra estratégia é chamada de reposicionamento de fármacos, cujo objetivo principal é a aplicação de compostos já conhecidos e comercializados para novas indicações ou tratamento de outra doença (LAW et al., 2013).

O reposicionamento de fármacos tem o potencial de reduzir tanto o tempo quanto o custo associado ao desenvolvimento de medicamentos. As abordagens de reutilização, portanto, são promissoras para identificar moléculas que possam tratar uma variedade de doenças, incluindo doença infecciosa, sobretudo, com o aumento nos casos de resistência microbiana aos fármacos atualmente disponíveis e o surgimento de cepas mutantes. Essa abordagem pode ser uma excelente aliada para o estabelecimento de novas terapias antimicrobianas (AZMI, 2012; LAW et al., 2013).

A ferramenta de reposicionamento é frequentemente associada à descoberta de um novo mecanismo de ação e elucidação de um novo alvo molecular, uma vez que a maioria das moléculas pequenas podem apresentar múltiplos alvos. É uma estratégia que recuperou o interesse das empresas farmacêuticas e cientistas acadêmicos por seu potencial para reduzir os investimentos, desencorajar atividades clínicas e encurtar o tempo necessário para comercializar uma molécula para seu novo uso (MAITRA et al., 2016; ANDRESEN; GJERTSEN, 2017).

Nesse projeto foi desenvolvida uma abordagem, envolvendo a investigação de uma estrutura que ainda não foi testada frente a TB. Seguindo a ideia de reposicionamento, trabalhamos, neste caso, com uma proposta de reutilização de uma molécula que já é aplicada para outros fins, porém nunca descrita como fármaco.

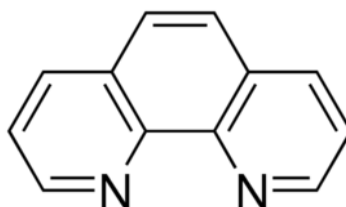
1.6 Complexos Metálicos e *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II)

O uso dos ligantes bipyridina (bipi) e fenantrolina (fen) tem sido extensivamente estudado por décadas por serem quimicamente versáteis, exibindo uma feliz combinação de propriedades estrutural e química. Estes tipos de ligantes foram amplamente empregados para se obter muitos benefícios, especialmente em combinação com diferentes metais de transição, encontrando diversas aplicações na terapêutica (GAO et al., 2016).

A 1,10-fenantrolina (1,10-fen), 2,2'- bipyridina (2,2'-bipi) e seus derivados, tanto no estado livre de metal ou coordenados com metais, perturbam o funcionamento de uma grande variedade de sistemas biológicos (MCCANN et al., 2004).

1,10-fen (Figura 4) é um composto heterocíclico contendo nitrogênio, conhecido como um ligante bidentado, clássico em química de coordenação, com grande potencial quelante para íons de metais de transição (BENCINI; LIPPOLIS, 2010). No ligante fen, quando as bases de N, N-quelantes estão isentas de metal são consideradas bioativas e geralmente supõe-se que o processo de sequestro de metais traços esteja envolvido, formando assim, complexos metálicos, que são considerados as espécies reais ativas (MCCANN et al., 2004).

Figura 4 – Estrutura química de 1,10-fenantrolina



Fonte: Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24848008> > Acesso em: 25/08/18.

Derivados de 1,10-fen destacam-se especialmente devido aos seus efeitos biológicos, suas aplicações em ciência dos materiais, em engenharia de cristais e por suas propriedades de complexação. Esqueletos policíclicos de fen também estão presentes em esteróis, hormônios sexuais, glicosídeos cardíacos, ácidos biliares e morfina (MATARNEH et al., 2016).

Alguns quelantes de metais de transição são altamente ativos em sistemas biológicos. Em estudos, 1,10-fen tem demonstrado mediar a morte microbiana em virtude de sua capacidade de se ligar ao DNA, ou por inibir a síntese da acetil-coenzima A, ou ainda, pela própria ação de quelar-se aos íons metálicos biológicos (KIDWAI et al., 2017).

Foi relatado que alguns complexos metálicos de fen podem ser bacteriostáticos ou bactericidas para diferentes bactérias diante a experimentos *in vitro*, porém, a maior parte deles são excluídos dos estudos por apresentarem toxicidade frente células eucarióticas e por serem extremamente tóxicos nos ensaios *in vivo*, principalmente frente camundongos e ratos (MCCANN et al., 2000, 2004). Em estudos prévios realizados pelo Laboratório de Pesquisa em Tuberculose da UNESP, foi investigada a atividade de diferentes complexos metálicos, em

especial moléculas contendo fen e rutênio (II) (Ru (II)), que demonstraram atividade promissora contra o *M. tuberculosis in vitro*, sendo observado nesses casos que o complexo como um todo mostrou-se diversas vezes mais ativo que seus ligantes livres (PAVAN et al., 2010, 2011).

Kidway et al. (2017) também relata, que complexos de fen-metal demonstraram inibir o crescimento de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium difficile* resistentes a fármacos e também inibem a formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, além de apresentar atividade fungistática (KIDWAI et al., 2017). Derivados químicos utilizando fen, íon cobre (Cu) (II) e a molécula da cumarina mostraram-se exercer a atividade antimicrobiana, antioxidante e antitubercular (DHOLARIYA et al., 2013).

Estudos mais antigos já investigavam atividade biológicas de quelatos de metais com fen e indicam que a velocidade de ação bactericida depende da natureza e propriedades do íon metálico e do ligante, isto é, nas características do complexo como um todo. Como os quelatos lábeis se mostravam ser mais rápidos, parecia provável que ação bactericida seria devido ao ligante fen ou então a um derivado contendo metal, formado no meio ou dentro da bactéria (BUTLER et al., 1969).

Moléculas mais complexas, mas que também continham em sua estrutura a fen e diferentes metais como prata (Ag (I)), manganês (Mn (II)) e Cu (II) também apresentaram atividades, que se diferenciavam dependendo do metal utilizado, indicando assim que as propriedades do íon metálico também interferem no modo de ação (COYLE et al., 2003, 2004).

Outra característica interessante em relação à complexação de metais é a capacidade em melhorar a atividade biológica de antibióticos. O ligante quinolona, por exemplo, devido a sua lipossolubilidade aumentada, quando complexado ao metal, tem-se uma maior facilidade no acúmulo intracelular e a coordenação de quinolona com cobre resulta em um aumento sinérgico de sua atividade antibacteriana. Complexos de metal com outros medicamentos antituberculosos, como a INH, também apresentam relatos de melhora nas atividades antibacterianas em comparação com as moléculas dos fármacos de origem (SAHA; PATITUNGKHO; PADHYE, 2005). Em geral, a coordenação de íons metálicos para agentes terapêuticos melhora sua eficácia e acelera a bioatividade (DHOLARIYA et al., 2013).

Diante disso, é possível afirmar que uma grande variedade de sistemas biológicos é afetada pelas próprias bases e também por seus complexos metálicos. Os efeitos, no entanto, são geralmente distintos, ficando evidente que princípios inteiramente diferentes estão envolvidos no modo de ação biológico para cada tipo de complexo.

Quando se trata de ambiente biológico, as moléculas capazes de formar complexos, ou seja, os ligantes livres, podem se ligar a íons metálicos que estão presentes no meio ou no fluido biológico, ou então a íons ligados à proteína por ligações de enxofre e/ ou nitrogênio. Assim, o íon metálico pode ficar indisponível para o sistema se a estabilidade do complexo formado for alta, e por outro lado, numa situação em que o íon metálico está ligado a uma superfície de proteína, pode-se ocorrer a inibição de enzimas por moléculas que irão se complexar. Dependendo da situação, a própria molécula orgânica pode ser o agente biológico eficaz sem a intervenção de um íon metálico ou então o complexo metálico formado é o responsável pela atividade (BRANDT; GYARFAS, 1954).

No caso de complexos metálicos já sintetizados e então administrados em ambientes biológicos, onde estarão como moléculas coordenadas saturadas e altamente estáveis quimicamente, é considerada a ideia de as próprias moléculas entrarem em reações químicas, nas quais esses complexos não devem ser afetados, devido a essa estabilidade (BRANDT; GYARFAS, 1954).

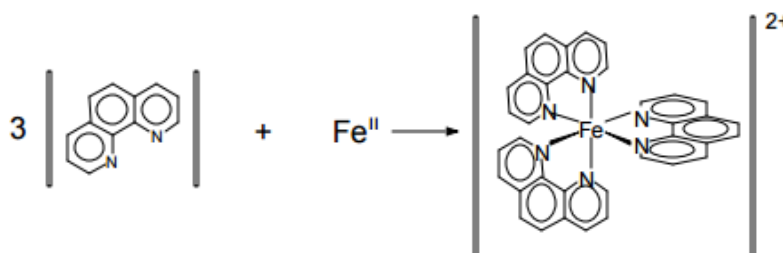
Várias observações devem ser consideradas para a tentativa de entendimento da ação de complexos em meio biológico. Numa investigação onde se testou ligantes (bipi e fen) variando os íons metálicos ferro, rutênio, ósmio, cobalto e zinco (Fe, Ru, Os, Co e Zn), descobriu-se que, quando o ligante é alterado o efeito biológico é bastante diferente. Estas observações indicam que a atividade é devida ao complexo como um todo e não aos seus fragmentos dissociados. Como nenhuma alteração química está envolvida, o modo de ação deve ser puramente físico, como a adsorção, por exemplo. As moléculas são fortemente adsorvidas em uma proteína e, provavelmente, em locais negativos. Como resultado da carga positiva presente nessas moléculas, elas podem alterar o ponto isoelétrico de proteínas e podem despolarizar superfícies carregadas. Ao ocupar sítios negativos, podem bloquear pontos ativos em enzimas. Qualquer que seja o efeito, é causado em virtude de sua carga positiva ou por sua mera presença em um sítio ativo (BRANDT; GYARFAS, 1954).

O ferro é o segundo metal mais abundante depois do alumínio e o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre. É um elemento essencial para o reino animal e vegetal, e de grande importância para a microbiologia, desempenhando papéis vitais em uma variedade de processos bioquímicos, por ser um dos micronutrientes essenciais. O elemento ferro pode formar complexos de grande estabilidade nos estados bi e trivalente, como tris-quelatos vermelhos com o ferro (II) (BRANDT; GYARFAS, 1954; SHYLA; BHASKAR; NAGENDRAPPA, 2012).

Sabe-se que alguns complexos de ferro com diferentes moléculas apresentaram atividade antimicobacteriana. TARALLO (2010) e colaboradores sintetizaram complexos de ferro que se mostraram bacteriostáticos ou bactericidas contra *M. tuberculosis*, *in vitro*, demonstrando citotoxicidade muito baixa em células eucarióticas (TARALLO et al., 2010).

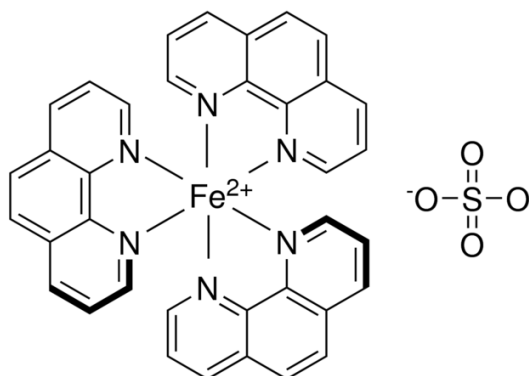
A complexação da molécula de 1,10-fenantrolina com ferro (II) leva ao complexo metálico, *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II), $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, (Figura 5). A interconversão entre o complexo ferroso intensamente vermelho, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e o complexo férrico azul, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{3+}$, é pensado para ser rápido e reversível na maioria dos casos (BELLÉR; LENTE; FÁBIÁN, 2010). O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, ilustrado na figura 6, exibe grande potencial redox e tem sido amplamente utilizado como precursor de outras reações químicas, além disso, já é descrita também alguma atividade biológica inicial, como atividade anti-fúngica, porém, não há relatos de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ ser utilizado como fármaco (BOTTEGA et al., 2016).

Figura 5 – Ilustração da reação de formação do complexo de Fe^{2+} com a 1,10-fenantrolina



Fonte: BREITKREITZ (2014).

Figura 6 – Estrutura química de *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) - $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$



Fonte: Disponível em <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/329749277> Acesso em: 28/08/2018.

A estabilidade termodinâmica desse tipo de complexo é maior devido principalmente à natureza hidrofóbica da fen e a consequente maior dessolvatação de cátions de metal após a formação do complexo (DHOLARIYA et al., 2013; KIDWAI et al., 2017).

Vários trabalhos relatam a investigação de compostos que utilizam 1,10-fen e metais, como discutido anteriormente. Entretanto, a maioria dos estudos tratam-se da adição de grupos químicos mais complexos que auxiliam na diminuição de toxicidade ou na própria ação biológica. $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ se destaca por exibir uma estrutura simples e facilidade de síntese, além de ser solúvel em água e apresentar baixo custo para sua obtenção, fatores relevantes para o tratamento e controle da TB, considerando a problemática da doença que atinge o mundo todo, principalmente países mais pobres (BRANDT; GYARFAS, 1954; HONG; KIM, 2018).

Diante disso, seguindo a estratégia de trabalhar com reutilização e nova aplicação da molécula de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, investigou-se nesse trabalho, pela primeira vez, os potenciais contra TB desse complexo, uma vez que a doença foi subexplorada na questão de terapias baseadas em metais (STRINGER et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade e os possíveis mecanismos de ação do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) - $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ contra *M. tuberculosis*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o perfil de atividade do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ através da:

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente ao *M. tuberculosis* em cepa padrão H₃₇Rv (ATCC 27294) em meio de cultura normal e modificado.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente isolados clínicos resistentes aos antimicrobianos e em bactérias no estado de latência (não replicante);

Determinação do índice de citotoxicidade (IC₅₀) frente a linhagens celulares MRC-5 (ATCC CCL-171), J774A.1 (ATCC TIB-67) e HepG2 (ATCC HB-8065);

Determinação da atividade intramacrofágica e atividade imunomoduladora;

Avaliação do espectro de atividade frente cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas;

Determinação da atividade mutagênica, em nível cromossômico, utilizando células humanas metabolizadoras, HepG2 (ATCC HB-8065);

Determinação da biodisponibilidade oral e toxicidade aguda em camundongos BALB/c.

Investigar o possível mecanismo de ação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ por:

Isolamento de mutante espontaneamente resistente e o sequenciamento genômico completo desse mutante;

Investigação de mecanismos relacionados à:

Inibição de síntese de ácidos micólicos da parede celular;

Inibição da síntese de proteínas;

Inibição de bombas de efluxo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) e cepas bacterianas

O complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) selecionado para este trabalho foi obtido da Sigma-Aldrich®.

As cepas de micobactérias utilizadas para avaliação da atividade e busca do mecanismo de ação do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) foram:

- Cepa sensível de *M. tuberculosis*: H₃₇Rv (ATCC 27294);
- Isolados clínicos resistentes aos antimicrobianos de *M. tuberculosis* coletados no Hospital Clemente Ferreira da cidade de São Paulo entre 2007 e 2009;
- Cepa sensível de *Mycobacterium smegmatis*: mc²155 (ATCC 700084).

Os cultivos bacterianos foram mantidos congelados em criotubos a -80°C em meio com 20% de glicerol. Para reativação, cepas sensíveis e resistentes foram cultivadas em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC) a 37°C sob agitação para utilização nos experimentos.

Os estudos foram realizados em 3 ensaios independentes, e análises estatísticas específicas foram utilizadas para cada um, por meio da análise de variância (ANOVA), estabelecendo $p < 0,05$ como nível de significância.

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

Foi realizada pelo método de REMA (*Resazurin Microtiter Assay*), de acordo com Palomino et al. (2002) com modificações. Em uma placa de 96 orifícios, a solução do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) foi diluída em Middlebrook 7H9 caldo (Sigma-Aldrich®) suplementado com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC), de forma que se obteve intervalos de concentração de 0,09 a 25 µg/mL. A rifampicina (RFP) em DMSO nas mesmas condições do complexo foi utilizada como fármaco controle. As cepas bacterianas de *M. tuberculosis* foram cultivadas em meio Middlebrook Caldo 7H9 enriquecido com OADC por aproximadamente uma semana. As culturas foram preparadas na escala 1,0 de Mc Farland e ajustadas para a concentração de 5×10^5 UFC/mL e então 100 µL do inóculo foi adicionado a cada poço da placa contendo o complexo nas diferentes concentrações. Essa placa foi incubada durante 7 dias

a 37 °C em estufa de CO₂ à 5%. Então, adicionou-se 30 µL de resazurina (solubilizado em água destilada e estéril) em cada orifício na concentração de 0,01% e incubou-se por mais 24h. Como resposta ao metabolismo celular, foi observada a redução da resazurina para resorufina, através da mudança colorimétrica e emissão de fluorescência, cuja cor rosa foi indicativo de viabilidade e a cor azul indicou morte celular. A leitura de fluorescência foi realizada no equipamento Cytation 3 (Biotek®) a 530/590 nm. A concentração do complexo que inibiu 90% do crescimento micobacteriano foi definida como CIM₉₀ (PALOMINO et al., 2002).

3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente o *M. tuberculosis* em estado de latência.

O método se baseia na utilização de micobactérias H₃₇Rv que contém o plasmídeo *pFCA-ABCDE*, capaz de produzir enzima e substrato que, como produto, emitem luminescência. Essa bactéria foi cultivada previamente em meio caldo Dubos acrescido de albumina (Difco®) por aproximadamente 30 dias em frasco hermeticamente fechado com volume preenchido de 2/3 com pouca aeração. Após este período, o cultivo bacteriano atinge o estado de latência (persistente sem replicação II (PSR II)) e então pode ser utilizado para o experimento (WAYNE; SOHASKEY, 2001).

A atividade do complexo em bactérias no estado latente foi determinada através do ensaio de recuperação com baixa oxigenação LORA (*Low Oxygen Recovery Assay*) (CHO et al., 2007). A solução estoque do complexo foi diluída em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, para obter a concentração final no intervalo de 0,391 a 100 µg/mL. Uma alíquota da cultura de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em latência (PSR II) foi adicionada a microplaca de 96 orifícios, branca, juntamente com o complexo permitindo um volume final de 200 µL com 2 x 10⁵ UFC/mL. A microplaca foi então colocada em jarra hermeticamente fechada acrescida de um catalisador de paládio, um gerador e um indicador de anaerobiose (Jarra de Anaerobiose - GasPak). A jarra foi incubada à 37 °C por 10 dias e então a placa foi retirada e transferida a um ambiente gasoso (condições ambientes) à 37 °C por 28 horas para a “recuperação” do metabolismo bacteriano. Depois das 28 horas realizou-se a leitura de luminescência (URL) através do Cytation 3 (Biotek®). A redução da viabilidade da bactéria sob condições de PSR II leva a uma diminuição no sinal de luminescência após recuperação aeróbia. A CIM₉₀, portanto, foi definida como a menor concentração do complexo capaz de inibir a multiplicação de 90% das células de *M. tuberculosis* em estado de latência (hipóxia).

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina e 10% de soro fetal bovino)

O estudo de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) foi estendido utilizando a mesma metodologia de REMA, empregando três condições ambientais distintas, consistindo em: ajuste do meio de cultura para o pH 6,0; incorporação de 4% de albumina no meio de cultura; e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (FRANZBLAU et al., 2012). Como controle, a CIM₉₀ da RFP foi determinada em cada condição de ensaio.

3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente isolados clínicos com perfis de resistência aos antimicrobianos

Os ensaios foram realizados seguindo a mesma metodologia de REMA com modificações, descrita no item 3.2 de acordo com Palomino et al. (2002). Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram cultivados em meio 7H9 suplementado com OADC a 37 °C e ajustados a concentração de 5×10^5 UFC/mL. 100 µL deste inóculo foram adicionados aos poços das microplacas que já continham 100 µL do complexo diluído. Nos ensaios frente a cepas resistentes de *M. tuberculosis* foram utilizados como controle os fármacos rifampicina (RFP), isoniazida (INH), moxifloxacino (MOXI) e estreptomicina (STR). As concentrações testadas dos fármacos variaram de 0,195 a 50 µg/mL e as concentrações do complexo utilizadas nesses ensaios variaram de 0,391 a 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 7 dias e após este período foram adicionados 30 µL da solução de resazurina (0,01% em água destilada estéril), como indicador de viabilidade bacteriana. A leitura e interpretação de fluorescência foram realizadas no Cytation 3 (Biotek®) a 530/590 nm e então pode-se determinar a CIM₉₀ de ([Fe(fen)₃]²⁺) frente as cepas com diferentes perfis de resistência.

3.6 Determinação do índice de citotoxicidade (IC₅₀) frente a linhagens celulares de macrófagos (J774A.1), fibroblastos (MRC-5) e hepatócitos (HepG2)

Para os ensaios foram utilizadas células J774A.1 (ATCC TIB-67), macrófagos de murinos; MRC-5 (ATCC CCL-171), fibroblastos humanos de pulmão; e HepG2 (ATCC HB-8065), hepatoma humano. As células foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI e DMEM (Vitrocell®), respectivamente, enriquecidos com 10% de soro fetal bovino (SFB) e

acrescidos de sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L), incubadas à 37°C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular. Uma concentração de 1×10^6 (J774A.1) e $2,5 \times 10^5$ (MRC-5 e HepG2) células/mL foram semeadas em microplacas de 96 orifícios, com volume final de 100 µL, incubadas por 24h à 37 °C com 5% CO₂ para permitir a adesão celular. O intervalo de diluições do complexo aplicado as placas após o período de 24h variaram de 2,00 a 500,00 µg/mL com tempos de tratamento de 24h, 48h e 72h nos quais as placas permaneceram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Após o período de tratamento foram adicionados 50 µL de 0,01% de resazurina (solubilizado em água destilada e estéril) e depois de 6h a leitura e interpretação de fluorescência foram realizadas no Cytation 3 (Biotek®) a 530/590 nm. O valor de IC₅₀ foi definido como a maior concentração do complexo em que 50% das células permaneceram viáveis. Em cada ensaio, a doxorrubicina foi utilizada como controle de fármaco (PAVAN et al., 2010).

3.7 Determinação do índice de seletividade (IS)

O cálculo do índice de seletividade do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) dado pela razão entre o IC₅₀ e a CIM₉₀ ($IS = IC_{50} / CIM_{90}$) foi realizado. São consideradas promissoras moléculas com IS igual ou superior a 10 (ORME, 2001; PAVAN et al., 2012). Ou seja, a concentração na qual o composto é citotóxico dista em pelo menos 10 vezes da qual ele é ativo contra o bacilo da tuberculose.

3.8 Determinação da atividade intramacrofágica e atividade imunomoduladora

A inibição de bactérias intracelulares, foi determinada através da infecção *in vitro* de macrófagos por bactérias *M. tuberculosis* H₃₇Rv. A linhagem celular de macrófagos de murinos J774A.1 (ATCC TIB-67) foi cultivada em meio RPMI até atingir a confluência necessária para serem utilizadas nos ensaios. A concentração celular para a avaliação intramacrofágica do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) foi de 5×10^5 cel/mL semeadas em placas de 24 poços com volume final de 1mL por poço. Essas placas foram incubadas por 24h a 37 °C, atmosfera a 5% CO₂. Seguindo a técnica proposta por Snewin (SNEWIN et al., 1999) e padronizada por Sato (SATO, 2003) em nosso laboratório, após a adesão celular, foi feita a lavagem desses poços com solução de PBS 10% e então acrescentou-se uma suspensão de micobactérias com MOI (*Multiplicity of Infection*) de 1 a 5 bactérias por macrófago. Após nova incubação de 2 horas, a qual permitiu a fagocitose, os poços foram lavados para a remoção de todas as bactérias que não foram

fagocitadas e então em cada poço adicionou-se 1 mL de amicacina a 200 µg/mL para eliminação completa das bactérias extracelulares. Para a confirmação de que ocorreu a fagocitose, foram lisadas as células de dois poços da placa com Triton 0,1% (Sigma®) e um volume desse lisado foi transferido para placa de petri contendo ágar Middlebrook 7H10 para análise da infecção pré-tratamento. Os poços foram então tratados com concentrações do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ que variaram entre o valor da CIM até 100x CIM diluídas em meio RPMI. Como controle, foi utilizada a RFP nas mesmas concentrações. As placas contendo células com bactérias intracelulares foram incubadas nas mesmas condições anteriores por 72 horas. Após esse período, os sobrenadantes de cada poço foram coletados e então os poços foram lisados com 1 mL de Triton 0,1% e o conteúdo de cada poço foi diluído seriadamente e semeado em placas de meio sólido Middlebrook 7H10. Essas placas foram incubadas por um período de 20-30 dias, a 37 °C e 5% de CO₂ para a contagem de UFC/mL. O resultado foi calculado como porcentagem de inibição do crescimento das micobactérias intracelulares pelo complexo comparado ao crescimento obtido dos poços sem tratamento após as 72h.

Os sobrenadantes coletados foram empregados para a quantificação dos seguintes mediadores imunológicos: *Transforming growth factor-beta* (TGF-β) e interleucinas (ILs): IL-2; IL-6; IL-10; IL-12; óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As concentrações das ILs e (TGF-β) foram avaliadas pelo método do ensaio imunoenzimático ELISA, utilizando Kits comerciais e de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante desses Kits (*BD Pharmingen e R&D System – DuoSet Elisa*). NO foi quantificado a partir da reação de *Griess*, onde 100µL de solução estoque de cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) a 0,1% e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5% (v/v) foram adicionadas às amostras. Após incubação, a leitura foi feita em comprimento de onda de 540 nm. Para a quantificação do H₂O₂, o reagente 1,2,3-diidrorodamina (DHR) em concentração 25µM foi adicionado ao sobrenadante e mantido protegido da luz por 15 minutos. Após este período, então, foi realizada a leitura em fluorímetro Cytation 3 (Biotek®) a 485 nm de excitação e 535 nm de emissão (MUIJSERS et al., 2000).

3.9 Espectro de Atividade

As cepas bacterianas testadas foram *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). O cultivo das espécies bacterianas foi realizado em placas com meio Luria-Bertani (LB) sólido, com repiques semanais. A cada três semanas o cultivo foi reiniciado

com suspensão bacteriana estoque mantida a -80 °C, com a finalidade de se evitar possíveis contaminações e resistência. Foi utilizado como controle um fármaco do grupo dos aminoglicosídeos, a gentamicina.

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

3.10 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₉) frente a *M. tuberculosis* em meio sólido

Para a realização dos ensaios tornou-se necessário a prévia determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₉) frente ao *M. tuberculosis* em meio sólido, uma vez que a metodologia utilizada para seleção de cepas resistentes é realizada por semeadura em placas de ágar 7H11.

Foram preparadas placas de ágar 7H11 contendo o complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) nas concentrações de 100 a 0,1953 µg/mL e, a partir dos resultados obtidos, o ensaio foi refeito com concentrações contidas entre 3,2 e 1,4 µg/mL. Foi feita a semeadura de 100 µL de uma solução de bactérias a 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Foram utilizados dois controles de crescimento sem tratamento; um controle utilizou bactérias a 10^5 UFC/mL que é a mesma concentração utilizada nas placas do teste e outro controle utilizou bactérias a 10^3 UFC/mL, pois no controle de 10^5 UFC/mL cresce um “tapete” bacteriano, não sendo possível fazer a contagem das colônias. As placas foram incubadas a 37 °C por um período de 4 a 5 semanas. Foi feito um cálculo da porcentagem de crescimento bacteriano. Esse cálculo consiste na divisão do número de UFC presentes no meio sólido com o complexo em diferentes concentrações pelo número de UFC presentes na placa controle (sem tratamento). O valor de CIM₉₉ foi aquele em que houve crescimento menor de 1% de UFC (PARISH; ROBERTS, 2015).

3.10.1 Isolamento e determinação da frequência das cepas resistentes de *M. tuberculosis*

A seleção de cepas resistentes ao complexo foi realizada seguindo a metodologia descrita por Gao et al. (2015). Placas de ágar 7H11 contendo o complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) na sua concentração de CIM obtido em meio sólido foram preparadas e então, um total de 10^9 UFC/mL foram semeadas nessas placas e incubou-se a 37 °C durante 3 a 4 semanas. As UFC que cresceram na placa foram selecionadas e semeadas para isolamento em placas de 7H11 contendo concentrações ainda maiores do complexo. O processo foi repetido até não aparecer mais colônias nas placas de seleção. As UFC que cresceram em placas de 7H11 com concentração mais elevada do complexo foram utilizadas para inocular o meio líquido 7H9 e então esse cultivo foi incubado a 37 °C durante 1 a 2 semanas. O cultivo passou por processos de centrifugação e as micobactérias foram ressuspensas em PBS 10% e mantidas congeladas em criotubos a – 80 °C.

Para determinar a taxa de mutação, a cepa sensível H₃₇Rv (10^7 UFC/mL) foi semeada nas placas contendo 1x, 2x, 4x e 8x o valor de CIM do complexo e mantida a 37 °C durante 4 a 5 semanas. Então a frequência de resistência para cada concentração de CIM é determinada através do cálculo do número de colônias que surgiram na placa seletiva dividido pelo total de unidades formadoras de colônia plaqueadas (GAO et al., 2015).

3.11 Ensaio presuntivo de mecanismo de ação relacionado à maquinaria de transcrição e tradução bacteriana

O ensaio que busca investigar possível mecanismo de ação relacionado à maquinaria de transcrição e tradução bacteriana foi realizado com cepas de *M. smegmatis* e micobacteriófagos D29. Portanto, tornou-se necessário, primeiramente, realizar a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) do complexo frente a *M. smegmatis*. Foi necessário também a produção de estoques de micobacteriófagos D29. Tais metodologias serão apresentadas abaixo, seguidas da metodologia do ensaio propriamente dito.

3.11.1 Produção de estoque de micobacteriófagos

Para produzir o estoque de vírus, foi adicionado a um tubo falcon o volume de 100 µL de uma suspensão de micobacteriófago D29 em uma concentração aproximada de 10^7 Unidades

Formadoras de Placas por mL (UFP/mL) e 500 μ L de bactérias *M. smegmatis* em uma concentração de 10^7 UFC/mL. Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, adicionou-se 3 mL de Middlebrook 7H9 com 0,7% de ágar, suplementado com 10% de ADC e CaCl_2 à 1 mM (meio semi-sólido) e 2 mL Middlebrook 7H9, suplementado com 10% de ADC e CaCl_2 à 1 mM (meio líquido). Essa mistura foi homogeneizada e colocada em placas de petri contendo Middlebrook 7H9 com 1,5% de ágar suplementado com 10% de ADC, e então as placas foram incubadas por 16-18 horas na temperatura de 37 °C. Após a incubação adicionou-se 1 mL de tampão de fago nas placas e incubou-se novamente por mais 1 hora à 37 °C. Em seguida, o líquido resultante, juntamente com o ágar semi-sólido das placas foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL. Nesses tubos foi adicionado etilenodiamino tetraacético (EDTA) 8% v/v e levados para centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde adicionou-se polietilenoglicol (PEG) 8000 10% v/v. Esses tubos foram incubados *overnight* na posição vertical em temperatura de 4 °C. Após a incubação os tubos foram centrifugados novamente, nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi então desprezado e o precipitado rico em micobacteriófagos D29 foi ressuspensionado em 3 mL de tampão de fago. Todo o material ressuspensionado foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado a 15.000 rpm por 20 minutos à temperatura de 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo do tipo eppendorf e armazenado na geladeira (PIURI; JACOBS; HATFULL, 2009).

3.11.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente ao *M. smegmatis*

O ensaio foi realizado através de modificações da metodologia de REMA descrita anteriormente (Palomino *et al.*, 2002). Nesse caso, o cultivo bacteriano de *M. smegmatis* foi realizado em meio Middlebrook 7H9 enriquecido com 10% de OADC (Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) acrescido de Tween 80 à 0,05%. O inóculo foi incubado por dois dias numa temperatura de 37 °C e utilizado no ensaio de REMA na concentração de 5×10^5 UFC/mL. Foram testados além do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), fármacos controle como RFP, INH e STR, afim de se determinar qual a concentração capaz de inibir 90% do crescimento micobacteriano.

3.11.3 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de proteínas

Para o ensaio presuntivo de mecanismo de ação relacionado à maquinaria de transcrição e tradução bacteriana, foi realizada uma adaptação do método descrito por Hugo David *et al.*

(1980). Uma alíquota do estoque de micobacteriófagos D29 foi diluída em tampão de fago, a fim de atingir a concentração desejado de 1×10^6 UFP/mL. Realizou-se um cultivo com *M. smegmatis* em caldo Middlebrook 7H9, contendo Tween 80, suplementado com ADC. O cultivo de *M. smegmatis* foi ajustado em uma concentração de 10^7 UFC/mL. Em tubos falcons de 15 mL foram adicionados 500 μ L do cultivo bacteriano mais 100 μ L de micobacteriófagos D29 para que ocorresse a adsorção dos fagos em 30 min a 37 °C. Após esse tempo foi adicionado o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ nos valores de CIM, 2x CIM, CIM/2 e CIM/4 em cada tubo a ser testado. Nesse momento também foram adicionados os fármacos controle (RFP, INH e STR) nos valores de CIM em cada tubo contendo bactérias e fagos. Nos respectivos tubos foram adicionados 3 mL de Middlebrook 7H9 com 0,7% de ágar, suplementado com 10% de ADC e CaCl_2 à 1 mM e 2 mL Middlebrook 7H9, suplementado com 10% de ADC e CaCl_2 à 1 mM. Essa mistura foi então homogeneizada e colocada em placas de petri contendo Middlebrook 7H9 com 1,5% de ágar suplementado com 10% de ADC e incubada por 16 horas na temperatura de 37 °C. Após esse período procedeu-se com a contagem e o cálculo de porcentagem de inibição de unidades formadoras de placas (UFP). A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com % de inibição do crescimento de micobacteriófagos em placas com tratamento em relação a placas sem tratamento, indicando um possível mecanismo de ação relacionado à maquinaria de síntese proteica (DAVID et al., 1980).

3.12 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de parede celular

A avaliação de mecanismo de ação de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ relacionado com a inibição da síntese dos ácidos micólicos constituintes da parede celular das micobactérias, foi realizado através de tratamento, extração e análise dos ácidos micólicos seguindo a metodologia de Jyoti e colaboradores, com modificações (JYOTI et al., 2015). Um cultivo de *M. tuberculosis* H₃₇Rv foi preparado em meio Middlebrook 7H9, suplementado com OADC a 10% por 5 dias. Realizou-se então um ajuste da concentração em DO₆₀₀ para 0,3 e 10 mL de cultivo foi incubado por 20h a 37 °C com ou sem tratamento. Nos inóculos tratados, o complexo e fármacos foram adicionados em seu valor de 2x CIM₉₀. Foram utilizados como controle os fármacos RFP, INH, etionamida (ETA) e etambutol (EMB). Após o tratamento, foram realizadas lavagens e extração dos ácidos micólicos por meio da adição de 10 mL de solução contendo metanol: tolueno: H₂SO₄ concentrado (10:10:0,4) e incubação a 50 °C por 16h-18h em banho-maria. Após, as amostras foram retiradas e resfriadas a temperatura ambiente e então adicionou-se 2 mL de hexano, seguido de vigorosa agitação e repouso para separação de fases. A solução do

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

3.13 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a inibição de bomba de efluxo

Para se determinar a capacidade do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em inibir a atividade das bombas de efluxo, realizou-se a técnica de acúmulo de brometo de etídio (EtBr), o qual possui a capacidade de se intercalar à cadeia de DNA, emitindo alta fluorescência intracelular. Assim, quando a atividade das bombas presentes em micobactérias é inibida, ocorre acúmulo de EtBr intracelular enquanto que, sem a inibição, a fluorescência aparente é baixa já que as bombas são capazes de exocitar o brometo que entra por difusão passiva (VARDEVANYAN et al., 2003; RODRIGUES et al., 2011). De acordo com a metodologia descrita por Caleffi-Ferracioli e colaboradores, um inóculo de *M. tuberculosis* H₃₇Rv foi ajustado para uma concentração em DO₆₀₀ de 0,4 e adicionou-se 100 µL dessa solução aos poços de uma microplaca de 96 poços. Foram acrescentados ainda, em concentrações iguais a $\frac{1}{2}$ CIM₉₀, 50 µL de EtBr e 50 µL do complexo e fármaco a serem testados. Como controles utilizou-se verapamil, composto inibidor de bombas e efluxo e cultivo micobacteriano sem tratamento (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2016). A placa então foi incubada em leitor de placas, Cytation H1, e a fluorescência foi lida a cada 3 minutos, pelo período de 1 hora, resultando em 21 pontos de uma curva analítica em gráfico de fluorescência relativa com relação ao tempo e através das curvas obtidas foi possível averiguar a capacidade do complexo em inibir a atividade das bombas de efluxo presentes nas micobactérias. A fluorescência relativa final (RFF) foi determinada utilizando-se a fórmula $(\text{FR}_{\text{ensaio}} - \text{FR}_{\text{ref}})/\text{FR}_{\text{ref}}$, onde $\text{FR}_{\text{ensaio}}$ é a fluorescência relativa no último ponto do tempo (60 minutos) do ensaio de acúmulo de EtBr com inibidor de bomba de efluxo, e FR_{ref} é a fluorescência relativa no último ponto do tempo (60 minutos) sem inibidor de bomba de efluxo.

3.14 Avaliação do potencial mutagênico utilizando a técnica de micronúcleo *in vitro*

O ensaio de mutagenicidade foi conduzido conforme descrito em Silva et al. (2017) com pequenas modificações. Células HepG2 foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células/poço em uma placa de 96 orifícios. Após 24 horas de incubação, o meio foi removido e as células foram tratadas com o complexo em 3 concentrações abaixo do IC₅₀ (previamente determinadas no ensaio de citotoxicidade) por um período de 24 horas. Os controles consistiram de células sem tratamento (controle negativo) e 1 mM H₂O₂ (controle positivo, 5 minutos de tratamento). Após isso, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com meio contendo 6 µg/mL de citocalasina B (Sigma-Aldrich®) por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS e fixadas com etanol por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram então coradas com FITC por 30 minutos a temperatura ambiente (a solução de FITC foi preparada a partir de um estoque a 10 mg/mL em DMSO. Foram diluídos 10 µL em 100 mL de PBS e 100 µL foram adicionados por poço). Em seguida os poços foram lavados com PBS por três vezes e as células coradas com solução de Hoechst 33342 a 5-µM em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. As imagens foram obtidas no aumento de 20x utilizando o leitor IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) utilizando os filtros de excitação: 352 (Hoechst 33342); 495 (FITC) nm e emissão: 461 (Hoechst 33342); 521 (FITC) nm. Foram analisadas 500 células /poço (SILVA et al., 2017).

3.15 Avaliação da biodisponibilidade oral

No sentido de aumentar a estabilidade e melhorar a biodisponibilidade oral, desenvolveu-se uma microemulsão contendo o composto para ser utilizada nos estudos *in vivo*. Esse tipo de sistema também pode potencializar a ação do composto e reduzir a dosagem e os possíveis efeitos colaterais. A composição dessa formulação foi de 10% de fase oleosa (colesterol), 10% de tensoativo (oleato de soja, fosfatidilcolina de soja e Eumulgin®) - (6:3:8) e 80% de fase aquosa (tampão fosfato pH 7,4) de acordo com o trabalho publicado por De Freitas et al. (2014). O desenvolvimento da microemulsão foi realizado pela Dra. Patrícia Bento da Silva no Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (DE FREITAS et al., 2014). Para o ensaio de biodisponibilidade oral foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade de 6 semanas e peso médio de 20-25 gramas procedentes do CEMIB/UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB). O experimento passou

pela aprovação prévia do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, registrada com os números de protocolos CEUA/FCF/FAR: 25/2017 e 26/2017.

A determinação da biodisponibilidade oral do complexo foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Gruppo et al. (2006). Um grupo de 4 animais recebeu uma dose oral (via gavagem) da microemulsão contendo o complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) a 300 mg/Kg de peso corpóreo. Nos tempos de 20 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após a administração foi realizada a coleta sanguínea via veia submandibular de acordo com Golde et al. (2005). Outros dois grupos de 4 animais foram utilizados, sendo que em um foi administrada a microemulsão vazia (controle de veículo) e no outro foi administrada apenas água (controle negativo). O plasma foi separado e armazenado a -80°C para a quantificação por meio do teste de REMA, descrito por Palomino et al. (2002). O plasma coletado dos camundongos foi utilizado a 10% para realização do teste REMA *in vitro* para determinar a quantidade de composto administrado que estava biodisponível no sangue após determinados tempos de coleta. O cálculo da estimativa da concentração do complexo no plasma foi realizado com base no valor da CIM_{90} já obtido frente ao *M. tuberculosis*, no qual $5,42\ \mu\text{g/mL}$ do complexo é capaz de inibir o crescimento de 90% da população bacteriana. Sendo assim, o cálculo foi realizado da seguinte forma:

$5,42\ \mu\text{g/mL} - 90\ \% \text{ de inibição}$ $x - \% \text{ de inibição obtida para cada tempo}$

Como foram utilizados apenas 10% de plasma para realização do teste, multiplicou-se o valor de x obtido por 10 para obtenção do valor de concentração do composto em 100% de plasma (GOLDE; GOLLOBIN; RODRIGUEZ, 2005; GRUPPO et al., 2006).

3.16 Determinação da toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado dois meses após o ensaio de biodisponibilidade oral no intuito de utilizar os mesmos camundongos e reduzir o número de animais em experimentos. Os animais estavam com idade entre 16-20 semanas e peso médio de aproximadamente 24-26 gramas. O perfil de segurança do complexo foi avaliado pelo

método clássico do ensaio de toxicidade aguda de acordo com a OECD (*Organization for Economic Cooperation Development*) de 2001. O complexo foi administrado em dose oral única (via gavagem) na concentração de 2.000 mg/Kg de peso corpóreo (n = 6 animais). Os animais foram monitorados por 14 dias para avaliação de parâmetros comportamentais (*screening* hipocrático). Foram avaliados 4 grupos de animais: *grupo controle negativo*: recebeu apenas água; *grupo controle de veículo*: recebeu a microemulsão vazia; *grupo comparativo*: recebeu o fármaco INH incorporado a microemulsão; *grupo teste*: recebeu o complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) incorporado a microemulsão. Ao final do experimento realizou-se a pesagem e então, animais foram eutanasiados em câmaras de CO_2 e seus órgãos (coração, pulmão, rins, baço e fígado) foram retirados cirurgicamente, pesados e analisados macroscopicamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente ao *Mycobacterium tuberculosis* em estado metabólico ativo e não-replicante

Os ensaios para determinação da atividade do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foram realizados frente a *M. tuberculosis* em estado metabólico ativo através do método de REMA e em estado de latência, frente a cepas não-replicas pelo método de LORA. Os resultados desses ensaios estão representados na tabela 2, a seguir.

Em relação a atividade do complexo contra cepas sensíveis de *M. tuberculosis* (H₃₇Rv) metabolicamente ativas, o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ exibiu um valor de concentração inibitória mínima (90) de 5,321 µg/mL, ou seja, o valor em que ocorre inibição de 90% do crescimento bacteriano (CIM₉₀). Nos ensaios frente a bactérias no estado de latência a CIM₉₀ apresentada pelo complexo foi de 12,276 µg/mL.

Tabela 2 - Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas sensíveis de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em estado metabólico ativo (REMA) e em estado de latência (LORA).

Moléculas	CIM ₉₀ (REMA)	CIM ₉₀ (LORA)
	µg/mL	µg/mL
$[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$	5,321 ± (0,11)	12,276 ± (0,22)
RFP	0,042 ± (0,004)	0,213 ± (0,026)
INH	0,065 ± (0,041)	152,452 ± (3,140)

Valores apresentados como média e desvio padrão ($M \pm DP$) de três ensaios independentes. REMA = Resazurin Microtiter Assay; LORA = Low Oxygen Recovery Assay. RFP = rifampicina; INH = isoniazida.

Diante dos resultados podemos destacar que o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi ativo contra *M. tuberculosis* tanto em seu estado metabólico ativo como em estado de latência. Embora tenha ocorrido um aumento no valor de CIM, a inibição continua sendo eficaz, uma vez que o estado não replicante dos bacilos é caracterizado pelo desenvolvimento de uma tolerância antibiótica considerável, apresentando falha no tratamento e grande resistentência à maioria dos agentes antimicrobianos clinicamente utilizados (SALINA et al., 2014; SIRICILLA et al., 2014).

A RFP, fármaco controle utilizado nesse ensaio demonstrou um aumento de CIM em mais de 5x frente bactérias no estado latente (CIM₉₀ igual a 0,042 µg/mL em estado metabólico ativo, para CIM₉₀ igual a 0,213 µg/mL em latência), porém, apesar desse aumento a RFP é bastante eficaz nesses casos (DEVASUNDARAM et al., 2015).

O estado anaeróbio não replicante é definido fisiologicamente como latência em micobactérias. Essa capacidade de deslocamento para o estado não replicante possibilita que os bacilos tuberculosos permaneçam dormentes no hospedeiro por longos períodos de tempo, com a capacidade de voltar ao estado replicante e ativar a doença mais tarde (SALINA et al., 2014; DEVASUNDARAM et al., 2015).

A tolerância aos medicamentos em bacilos não replicantes é descrita como resistência fenotípica aos fármacos, e deve-se a mudanças no estado fisiológico das bactérias, caracterizadas pelo baixo estado metabólico das células. Uma condição importante que acredita-se contribuir para a latência é o acesso reduzido ao oxigênio, conhecido como hipóxia (WAYNE, 2008; KIM; KIM, 2018).

De maneira geral, a maioria dos fármacos associadas à biossíntese de parede celular bacteriana apresentam pouca efetividade para a infecção latente da TB. Bactérias em baixo estado metabólico não estão em processo de replicação, portanto, a síntese dos ácidos micólicos da parede celular, é um mecanismo que está inativo na latência (SALINA et al., 2014). De acordo com essas informações foi utilizado nos ensaios de LORA, o fármaco isoniazida devido ao seu mecanismo de ação em inibir a síntese de parede bacteriana. Como esperado, INH apresentou um valor de CIM bastante alto comparado a CIM em bactérias metabolicamente ativas, esse fato comprova que para INH ser eficaz requer divisão e replicação ativa de bacilos de *M. tuberculosis* (ZUMLA et al., 2011).

4.2 Determinação do Índice de Citotoxicidade frente a linhagens celulares HepG2, J774A.1 e MRC-5

Os ensaios que avaliaram a toxicidade do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foram realizados *in vitro* frente a três linhagens celulares HepG2 (ATCC HB-8065), hepatocarcinoma humano; J774A.1 (ATCC TIB-67), macrófagos de murinos e MRC-5 (ATCC CCL-171), fibroblastos humanos de pulmão. Os resultados de IC₅₀ em diferentes tempos estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da determinação de índice de citotoxicidade (IC_{50}) do complexo $[(Fe(fen)_3]^{2+}$ frente a linhagens celulares J774A.1 (ATCC TIB-67), macrófagos de murinos e MRC-5 (ATCC CCL-171), fibroblastos humanos de pulmão em diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72h); e células HepG2 (ATCC HB-8065), hepatocarcinoma humano, em 24h.

Moléculas	Índice de Citotoxicidade IC_{50} ($\mu g/mL$)		
	Linhagem Celular (Tempo de Tratamento)		
	J774A.1 (24h/48h/72h)	MRC-5 (24h/48h/72h)	HepG2 (24h)
$[(Fe(fen)_3]^{2+}$	>500	>500	95,64
RFP	>100	>100	-
Doxo	0,0012 - 0,0024	0,0027 a 0,0016	0,0081

Valores apresentados como média de três ensaios independentes. RFP = rifampicina; Doxo = doxorubicina. (-) = não determinado.

O complexo não apresentou indício de toxicidade nas linhagens de células J774A.1 e MRC-5. Até a máxima concentração testada (500 $\mu g/mL$) nos ensaios, essas células permaneceram com 100% de viabilidade, não sendo possível estabelecer um IC_{50} , que representaria a concentração em que houvesse 50% de morte celular.

Nos ensaios frente a linhagem celular hepática, HepG2, o complexo exibiu um valor de IC_{50} igual a 95,64 $\mu g/mL$. A diferença observada entre as linhagens J774A.1, MRC-5 e HepG2, pode estar relacionada ao fato de que a HepG2 possui atividade metabólica com funcionamento de enzimas hepáticas de fase I e fase II o que pode acarretar em detoxificação ou mesmo ativação das moléculas contribuindo para o aumento da toxicidade (KNASMÜLLER et al., 1998).

A avaliação de citotoxicidade frente a macrófagos e fibroblastos foi realizada com exposição celular frente ao complexo em tempos de 24, 48 e 72h a fim de se encontrar um IC_{50} em tempos maiores que 24h. Apesar dessa tentativa, os resultados continuaram os mesmos, até após as 72 horas de tratamento não foi visualizado morte celular nessas duas linhagens.

A exposição celular ao complexo em até 72h em macrófagos J774A.1 também foi realizada com o objetivo de determinar qual concentração que permitiria 100% de viabilidade celular durante 3 dias de tratamento, para que fossem calculadas as concentrações a serem utilizadas nos ensaios intramacrofágicos, cujos resultados serão demonstrados mais adiante nesse trabalho.

A doxorubicina (doxo), molécula que exhibe perfil bastante citotóxico, foi testada como controle de morte celular e seu IC_{50} variou de 0,0012 a 0,0081 $\mu g/mL$ entre as células e tempos

testados nesse experimento. A rifampicina (RFP), fármaco de primeira linha no tratamento da TB também foi avaliada e assim como o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ não exibiu toxicidade frente as linhagens celulares J774A.1 e MRC-5 durante todos os tempos testados nos ensaios.

A avaliação citotóxica frente a três tipos de células eucarióticas demonstrou resultados favoráveis, uma vez que o complexo exibiu citotoxicidade baixa frente a uma linhagem celular metabolizadora e um perfil não citotóxico em altas concentrações frente aos macrófagos e fibroblastos, estabelecendo dessa forma, um nível preliminar de segurança que representa um dado importante que permite a continuidade da pesquisa em relação a uma molécula de estudo.

4.3 Determinação do Índice de Seletividade (IS)

A partir dos resultados obtidos de inibição micobacteriana e citotoxicidade foi possível estabelecermos o índice de seletividade (IS) do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. Aplicando o cálculo da razão de IC_{50} , o qual obtivemos um valor de ($>500 \mu\text{g/mL}$) frente as células J774A.1 e MRC-5 e um valor de ($95,64 \mu\text{g/mL}$) pela CIM_{90} ($5,321 \mu\text{g/mL}$), encontramos um valor de $\text{IS} > 90$ e $\text{IS} = 18$ respectivamente. Esse valor de IS, expresso na tabela 4, abaixo, indica que a concentração que o complexo é ativo contra *M. tuberculosis* está bastante distante da concentração que é tóxico, fornecendo um grau de confiabilidade na utilização desse complexo.

Tabela 4. Resultados da determinação do Índice de Seletividade (IS) do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ através da razão ($\text{IC}_{50}/\text{CIM}_{90}$).

Molécula	CIM_{90} ($\mu\text{g/mL}$)	J774A.1/ MRC-5		HepG2	
$[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$	$5,321 \pm (0,11)$	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
		> 500	> 90	95,64	18

CIM = Concentração Inibitória Mínima; IC = índice de citotoxicidade; IS = índice de seletividade.

Considerando que candidatos a novos medicamentos devem ter um índice igual ou superior a 10, com CIM inferior a $6,25 \mu\text{g/mL}$ e baixa citotoxicidade, o complexo metálico apresentou uma atividade bastante satisfatória, sendo classificado como candidato promissor contra a TB (ORME, 2001).

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente ao *Mycobacterium tuberculosis* em estado metabólico ativo submetido a diferentes condições

Os ensaios de CIM₉₀ em condições ambientais diferentes da normal (em pH 6,0; presença de 4% de albumina; e presença de 10% de SFB) foram realizados afim de investigar o comportamento do complexo submetido a condições similares encontradas em organismos vivos. O pH ácido, por exemplo, é encontrado no interior de macrófagos; a albumina é a proteína encontrada em maior concentração no plasma sanguíneo e o SFB tem em sua composição proteínas totais, α , β e γ globulinas, glicose, uréia, creatinina e hemoglobulina (YOUNGA; VERRECK, 2012). Os resultados de CIM₉₀ nessas condições encontradas frente ao *M. tuberculosis* para o complexo foram até 20 vezes menores comparados com a CIM em meio normal, assim, podemos sugerir que essas situações não irão impedir que o complexo mantenha a sua atividade *in vivo*.

É descrito que modificações realizadas na composição do meio de cultura para o cultivo de micobactérias ou para a execução de experimentos, são variáveis que afetam a CIM de medicamentos anti-TB padrão ou moléculas experimentais, podendo tanto afetar no crescimento das bactérias, como interferir no comportamento e propriedade dos compostos, como por exemplo, estabilidade e solubilidade (FRANZBLAU et al., 2012).

A adição de 10% de SFB ou albumina em 4% podem ser aplicadas sem comprometer a viabilidade ou crescimento de *M. tuberculosis*. Tanto o soro como a albumina podem ser utilizados simultaneamente ou separadamente para diferenciar os efeitos específicos da albumina daqueles possivelmente causados por outros constituintes séricos. Esse acréscimo de soro e aumento na concentração de proteína podem representar características mais próximas daquelas encontradas em um organismo vivo, uma vez que os meios de cultura existentes não usam concentrações de proteína que refletem as concentrações fisiológicas (UPADHYE et al., 2009; FRANZBLAU et al., 2012).

A determinação de CIM em pH mais baixo reflete característica direta da patogenia de *M. tuberculosis*, uma vez que o interior de macrófagos apresenta menores pHs. O bacilo ao ser fagocitado poderá sobreviver nesse ambiente hostil e fármacos que possam atingir as bactérias nessa situação também precisarão manter sua eficácia frente à acidificação do meio (ROSEMBERG, 2001).

Os resultados obtidos nos ensaios utilizando meios modificados (Figuras 7 e 8) demonstraram uma melhor eficácia do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ evidenciada pela diminuição

das CIMs nas 3 situações testadas. O controle utilizado foi a RFP que como esperado demonstrou atividade, porém apresentou diferença estatística, demonstrando diminuição da sua eficácia em situações de acréscimo de albumina e pH mais ácido.

Figura 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) em diferentes condições do meio de cultura.

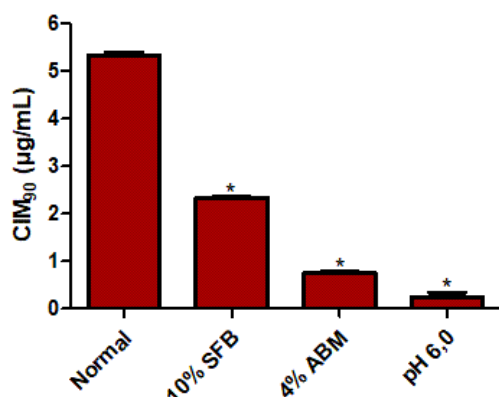
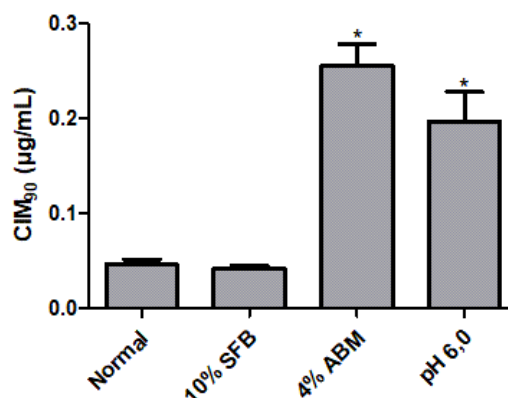


Figura 8 - Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) do fármaco RFP em diferentes condições do meio de cultura



Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv pelo complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) (Figura 7) e rifampicina (Figura 8) em diferentes condições do meio de cultura. (Meios: Normal; 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); 4% de Albumina (ABM); pH = 6,0) Análise estatística: Prisma 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes. * = Diferença estatística encontrada em valores de CIM comparadas ao meio normal.

Para o complexo metálico, nas 3 situações testadas de modificação do meio os valores de CIM diminuíram, demonstrando diferenças estatísticas com a CIM em meio normal. Esses resultados são bastante satisfatórios pois demonstram que a ação anti-TB do complexo é mais pronunciada em ambientes mais próximos da fisiologia humana.

Esses resultados podem nos direcionar em relação ao potencial de ([Fe(fen)₃]²⁺) se ligar a proteínas plasmáticas, uma vez que a albumina seja a proteína sérica mais comumente envolvida na ligação significativa de fármacos e outras encontrados no SFB como glicoproteína alfa 1, lipopeptídeos e globulinas também podem estar envolvidos (FRANZBLAU et al., 2012). Dessa forma a atividade melhorada de ([Fe(fen)₃]²⁺) é indicativo de não ligação com proteínas, porém essas proteínas de alguma forma podem estar auxiliando na atividade do complexo. Ou ainda, podemos relacionar o fato de que o aumento dessas porções ao meio de cultura possa estar ocasionando uma saturação do ambiente fazendo com que os bacilos tenham mais dificuldade em retirar desse meio saturado seus nutrientes e assim, o crescimento de *M. tuberculosis* estando prejudicado auxilia a ação antimicrobiana do complexo. A RFP, utilizada

como controle nesses experimentos, aumentou o valor de CIM em mais de 5x nos ensaios com acréscimo de albumina no meio, fato que pode ser explicado pela sua capacidade em se ligar em 80% a proteínas plasmáticas (SHISHOO et al., 2001).

Em relação ao meio com pH mais baixo é bastante benéfica a atividade do complexo ser melhorada em mais de 20 vezes, indicando que a molécula não perde sua estabilidade em pH menor, principalmente por ser o pH presente em macrófagos, ambiente em que a maioria dos bacilos permanecem durante a doença.

Os resultados obtidos para o complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) nesses experimentos representam dados inéditos diante de uma molécula de estudo, uma vez que as informações existentes na literatura relatam diminuição ou perda de atividade quando os ensaios são realizados com mudanças no meio de cultura, que deixam esse meio mais próximo de características fisiológicas de um organismo humano (FRANZBLAU et al., 2012; DOS SANTOS FERNANDES et al., 2017).

4.5 Avaliação do espectro de atividade

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

Tabela 5 - Resultados da atividade do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) frente diferentes cepas bacterianas Gram-positivas e negativas, cálculo da concentração inibitória de 90% (CIM₉₀). Valores apresentados como média (M) $\pm$ desvio padrão (DP) de três ensaios independentes.

Bactéria	ATCC	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
		$[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$	Gentamicina
<i>Escherichia coli</i>	11775	>100	5,07 $\pm$ 0,14
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	>100	1,16 $\pm$ 0,39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13388	>100	2,02 $\pm$ 0,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	>100	3,97 $\pm$ 2,4

CIM = Concentração Inibitória Mínima.

O complexo pode ser classificado como uma molécula de espectro de atividade estreito, diante da sua atividade contra *M. tuberculosis* e outras cepas bacterianas testadas. ([Fe(fen)₃]²⁺) não apresentou um valor de CIM₉₀ frente a bactérias testadas Gram-negativas e Gram-positivas, (Tabela 5) sendo, portanto, específico em inibir micobactérias, já que apresentou CIM₉₀ contra espécies *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*.

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente isolados clínicos de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de resistência

A atividade do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) foi testada frente a isolados clínicos com diferentes perfis de resistência aos fármacos utilizados na terapia contra a TB e os resultados são demonstrados na tabela 6, abaixo. Os isolados são classificados em monorresistentes, bactérias resistentes a múltiplos fármacos (MDR-TB) e bactérias extensivamente resistentes (XDR-TB), de acordo com o número e tipo de antimicrobiano que apresentam resistência.

Tabela 6 - Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de resistências aos antimicrobianos utilizados no tratamento da TB. A tabela expressa também mutações já determinadas para esses isolados.

Cepa ^a	CIM ₉₀ (µg/mL)					Mutação (genes) ^b				
	RFP	INH	MOXI	STR	([Fe(fen) ₃] ²⁺)	<i>rrs</i>	<i>gyrA</i>	<i>KatG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>
20	<0,195	>50	<0,195	2,63 ± 0,22	26,9 ± 4,25	G1484T	ND	ND	ND	C531T
85	<0,195	12,45 ± 1,23	<0,195	0,48 ± 0,14	10,35 ± 0,09	-	-	G315C	ND	ND
97	>50	>50	0,337 ± 0,04	13,45 ± 2,04	8,66 ± 1,22	-	-	ND	ND	CA526TG
100	0,38 ± 0,13	>50	<0,195	0,378 ± 0,09	1,49 ± 0,03	A1401G ou C1402T e G1484T	A94G	ND	ND	C531G
110	3,71 ± 1,28	>50	0,35 ± 0,19	6,02 ± 0,18	5,89 ± 0,02	ND	-	ND	ND	C531T
172	>50	>50	2,619 ± 0,32	1,476 ± 0,013	3,46 ± 0,14	G1484T	A90V	ND	C15T	C531T
176	8,09 ± 1,11	23,07 ± 2,55	2,39 ± 0,12	4,85 ± 0,07	2,10 ± 0,03	ND	-	G315C	ND	C531T

^a Cepas resistentes de *M. tuberculosis*: isolados clínicos coletados no Hospital Clemente Ferreira da cidade de São Paulo entre 2007 e 2009. ^b Mutações determinadas pelo nosso laboratório em trabalhos anteriores (Dados não publicados); (ND) = mutação não detectada; (-) = mutação não determinada. Em vermelho valores de CIM₉₀ que representam resistência e em azul, valores de CIM₉₀ que representam sensibilidade aos fármacos testados. Fármacos controle testados: RFP = rifampicina; INH = isoniazida; MOXI = moxifloxacino; STR = estreptomicina.

O complexo apresentou valores de CIM₉₀ iguais ou melhores em 4 isolados clínicos, de 7 testados, comparado com o valor de CIM₉₀ frente a cepa sensível H₃₇Rv. Esses isolados clínicos foram: 100 (monorresistente à INH); 110 (MDR-TB); 172 (MDR-TB) e 176 (XDR-TB).

A atividade do complexo frente os isolados 20 (resistência a INH e STR), 85 (monorresistente à INH) e 97 (MDR-TB) foi menos eficaz, apresentando valores de CIM₉₀ 1,5x maior para o 97, 2x maior para o 85 e 5x maior frente ao isolado 20, valores comparados ao valor de CIM₉₀ frente a cepa sensível H₃₇Rv.

Os índices de TB resistente aos antimicrobianos foram declarados como ameaça mundial pela OMS, representando um grande desafio no controle e tratamento da doença. Os tratamentos disponíveis para esses casos acompanham inúmeras reações adversas, toxicidade, além de representarem maiores custos e menor eficácia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Uma molécula que contorne mecanismos de resistência e seja ativa em bactérias resistentes, superando o problema da toxicidade ao paciente, representaria um grande avanço no combate à doença. É com esse objetivo que a OMS declarou em 2017 o *M. tuberculosis* como um agente patogênico prioritário para pesquisa e desenvolvimento contínuo de novos antimicrobianos (WHO, 2017).

A atividade evidente de ([Fe(fen)₃]²⁺) em bactérias resistentes destaca essa molécula e impulsiona ainda mais a investigação de seu modo de ação, bem como próximos passos que determinem a segurança e eficácia *in vivo*.

Além disso, o complexo por ser ativo em bactérias com perfis de resistência a diferentes antimicrobianos exibe a característica de não apresentar resistência cruzada, mostrando dessa forma, que age em vias que não são comuns à ação de outros fármacos utilizados no tratamento da TB.

A existência de um novo mecanismo de ação representa um grande passo para o desafio da resistência em TB, pois essa molécula por não ser ineficaz em bactérias MDR ou XDR-TB exibe um potencial promissor a ser inclusa como uma nova opção para tratamento desses casos (MALINGA et al., 2016).

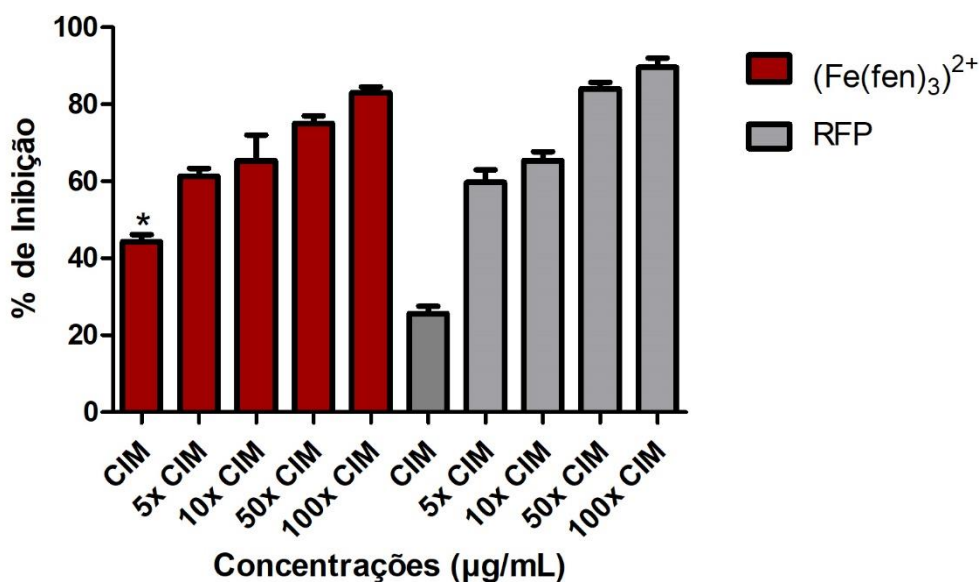
4.7 Determinação da atividade intramacrofágica e imunomoduladora

4.7.1 Atividade intramacrofágica

Através de ensaios intramacrofágicos foi possível determinar o potencial de inibição do complexo frente a bacilos fagocitados no interior de macrófagos J774A.1. O ensaio permitiu que fossem testadas concentrações do complexo até 500 µg/mL, variando dessa forma, entre valores de CIM, 5, 10, 50 e 100x CIM. Essas concentrações mais altas foram possíveis de serem avaliadas devido ao fato de o complexo não apresentar citotoxicidade em células macrofágicas em até 72 horas, tempo em que ocorre o tratamento e duração do ensaio intramacrofágico.

A inibição de *M. tuberculosis* intracelular exibida por $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi crescente de acordo com o aumento da concentração do complexo, variando de 44% na concentração da CIM até 83% em 100x CIM. Esse aumento de inibição concentração dependente também foi observado para o fármaco controle rifampicina, como demonstrado na figura 9.

Figura 9 - Atividade Intramacrofágica



Resultados da inibição intramacrofágica de *M. tuberculosis* pelo complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e rifampicina (RFP) em diferentes valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) após tratamento de 72 horas. Análise estatística: Prisma 5.0, one-way ANOVA com pós-teste Newman-keuls. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes. * = Diferença estatística encontrada em valores de inibição de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ comparado com valores de inibição do fármaco controle (RFP = rifampicina) nas mesmas concentrações de CIM.

O complexo se mostrou mais ativo em inibir bacilos intracelulares na concentração de sua CIM do que a rifampicina na mesma situação. Esse resultado é condizente com os resultados

encontrados nos ensaios descritos no item 4.4 deste relatório, nos quais o complexo mostrou-se mais ativo em pH igual a 6, sendo o mesmo pH encontrado no interior dos macrófagos, já a rifampicina, demonstrou menor atividade nessa situação e uma eficácia também menor em inibir bactérias intracelulares na sua concentração de CIM₉₀. Além disso, diante desses resultados, fica sugestivo que ([Fe(fen)₃]²⁺) permeie o macrófago para atingir a micobactéria.

O patógeno da TB, como comentado anteriormente, pode persistir dentro de células macrofágicas e nesses casos, geralmente, o tratamento é mais difícil devido ao acesso limitado de fármacos a bactérias dentro dos macrófagos, necessitando de tratamento crônico com altas doses terapêuticas para controle efetivo e tratamento da doença (SCHWARTZ et al., 2006). Portanto, uma molécula que iniba o crescimento em cerca de 50% da infecção intracelular já na sua concentração de CIM se destaca como uma atividade bastante interessante, considerando ainda, que a dose dessa molécula poderá ser aumentada em mais de 100x para atingir níveis de inibição ainda maiores, exibindo um intervalo de citotoxicidade confiável.

4.7.2 Atividade imunomoduladora

Alguns antimicobacterianos como RFP e INH exibem atividade intramacrofágica contra *M. tuberculosis*, porém outros apresentam baixa eficácia em bacilos intracelulares, devido a incapacidade de invadir e acumular em macrófagos. Durante a pesquisa de novos medicamentos para o tratamento da TB, é altamente relevante o candidato a novo fármaco exibir atividade intracelular, seja por mecanismo direto atingindo micobactérias ao entrar nas células macrofágicas ou então, indiretamente, por apresentarem efeitos imunomoduladores que ativam a morte intracelular (PODDER et al., 2015).

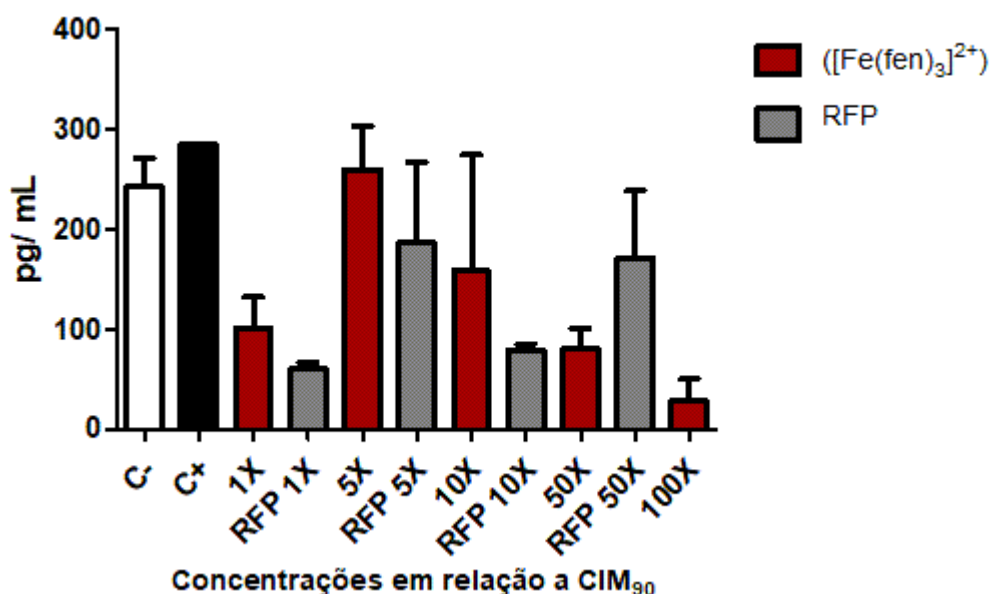
Através do ensaio intramacrofágico nesse estudo, foi possível identificar um favorável potencial inibitório de ([Fe(fen)₃]²⁺) no crescimento intracelular de micobactérias, porém o ensaio não desvenda por qual mecanismo o complexo exibe esse perfil, ou seja, se atinge o bacilo atravessando o célula, ou exerce efeito imunomodulador ativando o macrófago e assim, ocasionando a morte bacteriana.

Portanto, com o objetivo de investigar mais claramente a ação intracelular do complexo, realizou-se a quantificação de mediadores imunológicos nos sobrenadantes coletados durante o ensaio intramacrofágico.

As citocinas investigadas: IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12 não apresentaram níveis de concentração suficientes e por isso, após tentativas de quantificação, não foi possível a detecção pelos kits utilizados. A produção da citocina TGF- β foi detectada, porém não é possível determinar um padrão de produção ou inibição durante ambos os tratamentos, com $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ ou RFP (Figura 10). Pode-se observar de maneira geral, que os níveis de TGF- β são diminuídos conforme a concentração de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é aumentada, em relação aos níveis demonstrados por macrófagos livres ou infectados sem tratamentos.

Quando as micobactérias sobrevivem e se multiplicam nos macrófagos, altos níveis de citocinas imunossupressoras, como o TGF- β , são produzidos. Sugere-se que o TGF- β possa apresentar um papel regulador e potencialmente negativo no contexto da infecção por *M. tuberculosis*, pois, desempenha um perfil inibitório nas respostas do hospedeiro durante a doença da TB (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2015; DOMINGO-GONZALEZ et al., 2016).

Figura 10 - Quantificação da produção de TGF- β em ensaios intramacrofágicos

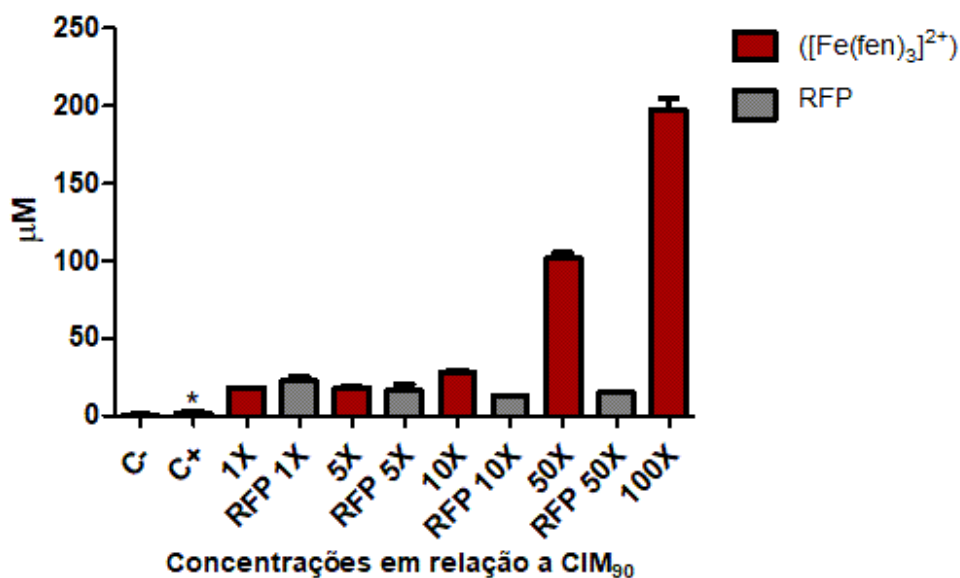


Resultados da quantificação de TGF- β em sobrenadantes coletados durante os ensaios intramacrofágicos. CIM = Concentração Inibitória Mínima. (C-) = Controle de macrófagos livres sem tratamento; (C+) = Controle de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* sem tratamento. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes. Análise estatística: Prisma 5.0, *one-way* ANOVA com pós-teste *Newman-keuls* = Nenhum dos valores apresentou diferença estatística em comparação ao C+.

Macrófagos livres e macrófagos infectados sem tratamento não demonstraram produção significativa de óxido nítrico (NO), como demonstrado na figura 11. Quando $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é adicionado como tratamento, a detecção de NO foi crescente, conforme o aumento nas

concentrações do complexo. RFP manteve níveis baixos e constantes de NO, mesmo com o aumento nas concentrações.

Figura 11 - Quantificação da produção de NO em ensaios intramacrofágicos



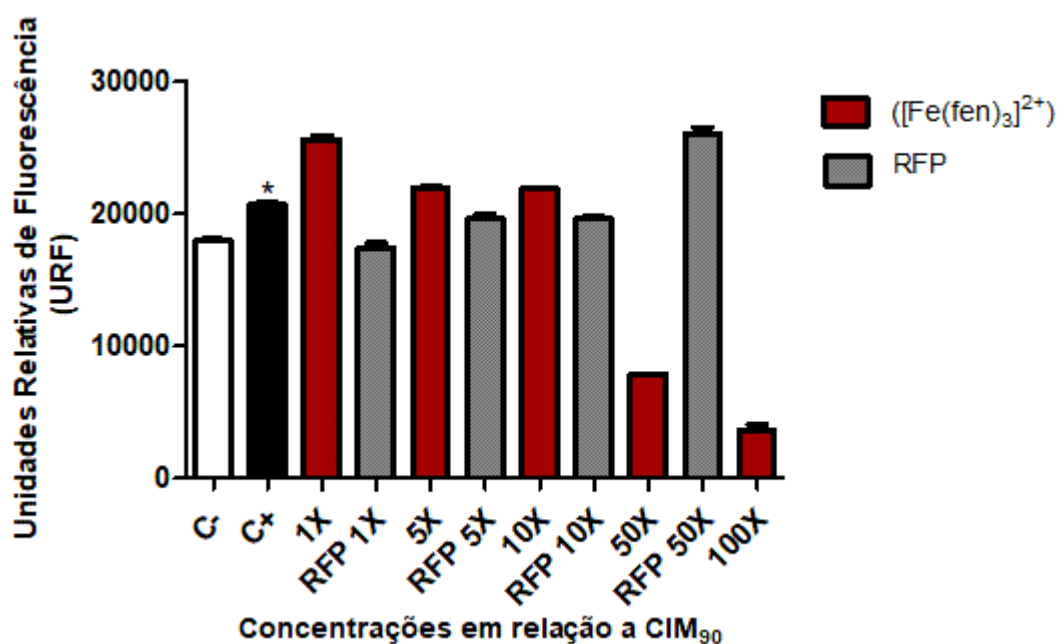
Resultados da quantificação de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes coletados durante os ensaios intramacrofágicos. CIM = Concentração Inibitória Mínima. (C-) = Controle de macrófagos livres sem tratamento; (C+) = Controle de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* sem tratamento. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes. Análise estatística: Prisma 5.0, *one-way* ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. * = Diferença estatística encontrada para C+ em relação a todos os tratamentos testados nos diferentes valores de CIM.

Sabe-se que macrófagos possuem a capacidade de destruir o *M. tuberculosis*, sendo considerados, por isso, as principais células envolvidas no processo imunitário. O macrófago ativado pelas citocinas, aumenta o diâmetro e o número de vacúolos fundidos com os fagolisossomos distribuídos no citoplasma. Com a interveniência do interferon gama e fator de necrose tumoral, o macrófago ativado adquire a capacidade de produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO), com os quais consegue eliminar o *M. tuberculosis* (ROSEMBERG, 2001; SHARMA et al., 2014; PODDER et al., 2015). O poder microbicida de NO é maior que de H₂O₂, porém tanto NO, quanto H₂O₂, atuam por serem oxidantes lesivos a micobactéria (ROSEMBERG, 2001).

Entretanto, a presença de superóxido desmutase ou de catalase decompõe H₂O₂ em água, anulando a capacidade de destruir o bacilo. Existem cepas do *M. tuberculosis*, que se defendem contra o H₂O₂ aumentando a atividade das catalases (ROSEMBERG, 2001).

Na quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), neste ensaio (Figura 12), macrófagos livres e infectados mostraram produzir níveis consideráveis e o complexo demonstrou uma produção ainda maior em sua concentração da CIM_{90} , porém, os níveis de H_2O_2 foram diminuindo de acordo que a concentração foi aumentando. No tratamento com RFP, ao contrário do complexo, houve aumento dos níveis de H_2O_2 , conforme aumentou-se a concentração do fármaco.

Figura 12 - Quantificação da produção de H_2O_2 em ensaios intramacrofágicos



Resultados da quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em sobrenadantes coletados durante os ensaios intramacrofágicos. CIM = Concentração Inibitória Mínima. (C-) = Controle de macrófagos livres sem tratamento; (C+) = Controle de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* sem tratamento. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes. Análise estatística: Prisma 5.0, one-way ANOVA com pós-teste Newman-keuls. * = Diferença estatística encontrada para C+ em relação a todos os tratamentos testados nos diferentes

Diante dos resultados obtidos nas quantificações dos sobrenadantes intramacrofágicos podemos observar que durante o tratamento, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ induz a produção de NO, o que pode e provavelmente contribuiu para a inibição do crescimento e morte de *M. tuberculosis*. O tratamento com $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ suprimiu a expressão de TGF- β a níveis semelhantes ou mais baixos que células não infectadas. A diminuição dos níveis de H_2O_2 durante o tratamento pode estar relacionada com sua degradação através da ação das catalases em *M. tuberculosis*, que aumentaram sua atividade conforme aumentou-se a concentração do complexo, sugerindo a possibilidade de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ estimular a atividade dessas enzimas.

Esses resultados seguem o padrão encontrado no trabalho realizado por López Garcia 2015 e colaboradores, no qual após o tratamento com os compostos estudados por eles, os macrófagos infectados exibiram uma diminuição na produção de TGF- β e alta produção de NO, sendo descrita também uma considerável capacidade de eliminação de micobactérias intracelulares (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2015).

Diante da complexidade das atividades imunológicas envolvidas durante a infecção da TB, novos ensaios que possibilitem a realização de novas quantificações de mediadores imunológicos serão necessários, para que se possa classificar com precisão a atividade imunomoduladora do complexo. Porém até o momento ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) exerce aumento de NO, diminuição de H_2O_2 e diminuição de TGF- β em macrófagos, sendo capaz de controlar e eliminar a infecção intracelular.

4.8 Avaliação da biodisponibilidade oral

Com o ensaio de biodisponibilidade oral realizado através da aplicação de dose oral única do complexo em camundongos BALB/c foi possível determinar de forma estimada a concentração do complexo disponível no plasma dos animais em tempos diferentes, nos quais foram coletados o sangue após a aplicação dessa dose de 300 mg/kg/corpo.

Os tempos de coleta de sangue inicialmente foram 20 minutos, 1h, 2h e 4h e as concentrações plasmáticas do complexo foram detectadas apenas a partir de 2h após a aplicação por via oral. As concentrações presentes no plasma foram 18,5 $\mu\text{g/mL}$ e 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em 2h e 4h, respectivamente.

Esse perfil apresentado *in vivo* nos permite classificar o complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) como uma molécula de absorção lenta por via oral, sendo necessário 2h para se detectar sua presença no plasma de camundongos. Como não foi possível determinarmos um perfil completo de absorção do complexo, pois até as 4h do ensaio não houve uma queda na concentração plasmática, não pudemos detectar em qual tempo ocorreria a $\text{C}_{\text{máx}}$ (concentração plasmática máxima) e em qual tempo aconteceria a queda dessa concentração. Devido a esse fato, realizamos novos experimentos de biodisponibilidade oral em novos grupos de camundongos, onde estendemos os tempos de coleta de sangue em 6, 8, 12 e 24h após a administração, para podermos analisar um perfil mais completo de biodisponibilidade plasmática do complexo. Os resultados são apresentados na tabela 7 a seguir.

Tabela 7 - Resultado de Biodisponibilidade do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), demonstrado por níveis de concentração plasmática em diferentes tempos após administração oral única (300 mg/kg/corpo) em camundongos BALB/c.

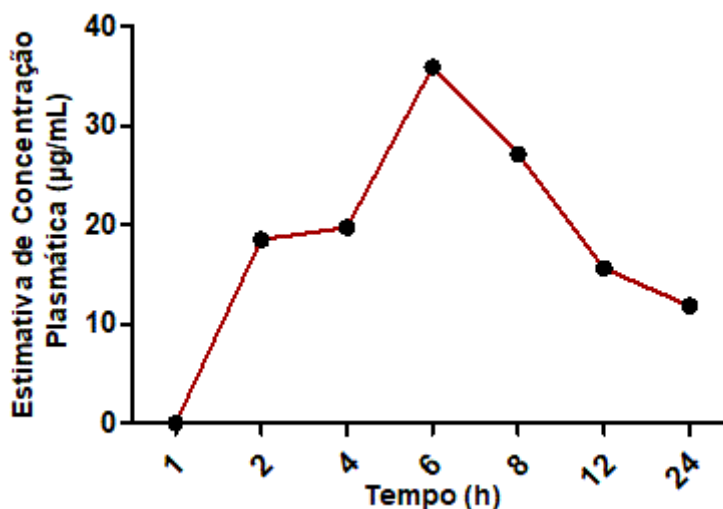
Tempos de Coleta ^a Horas (h)	Inibição ^b (%)	Estimativa ^c ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0,3	0	0
1	0	0
2	$32,5 \pm 2,1$	18,5
4	$33,5 \pm 8,2$	19,7
6	$61,0 \pm 2,8$	35,9
8	$46,0 \pm 5,6$	27,1
12	$26,5 \pm 4,9$	15,6
24	$20,0 \pm 5,6$	11,8

a – Tempos de coleta de sangue em camundongos BALB/c após administração oral; b - Inibição de *M. tuberculosis* utilizando plasma de camundongos pelo método de REMA *in vitro*; os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois ensaios independentes; c – Cálculos de estimativas de concentração de ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) no plasma.

Pelos resultados obtidos através do estudo *in vivo*, podemos constatar o aparecimento do complexo ou forma ativa dele no plasma dos animais a partir de 2h após a administração oral, apresentando um aumento mínimo em 4h. Após 6h da administração foi possível identificarmos um pico na concentração plasmática e, portanto, provavelmente a $\text{C}_{\text{máx}}$ ocorre em torno desse tempo. No tempo de 8h pode-se observar que a concentração já havia apresentado queda em relação ao pico das 6h e então essa diminuição na concentração plasmática ocorreu gradativamente em 12h e em 24h após a administração, que foi o tempo da última coleta de sangue nos camundongos. Porém em até 24h a excreção não foi completa, uma vez que ainda foi possível a quantificação no plasma.

Dessa forma obtivemos o provável perfil de biodisponibilidade da molécula em camundongos BALB/c, como mostra a figura 13 e nos foi possível calcular de forma estimada a quantidade ativa desse complexo presente na corrente sanguínea, que é a forma capaz de combater a infecção, uma vez que inibiu o crescimento de *M. tuberculosis* quando aplicamos o plasma em estudos *in vitro*. Dados publicados nos mostram que antimicrobianos utilizados no tratamento da TB apresentam picos de concentração plasmática máxima após administração oral em torno de 2 a 4h, como é o caso, por exemplo, de INH e RFP, sendo comum que medicamentos não apresentem excreção completa em até 24h após administrados (ARBEX, 2010).

Figura 13 – Curva de Biodisponibilidade



Resultados da estimativa de concentração plasmática pelo tempo após administração oral única (300 mg/kg/corpo) do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em camundongos BALB/c.

É sabido que através do ensaio realizado nesse trabalho tem-se um *screening* farmacocinético simples que prediz a quantidade que se pode administrar por via oral para que o complexo permaneça em doses suficientemente ativas em determinado período de tempo. No entanto, devemos considerar que esta metodologia não avalia parâmetros farmacocinéticos e farmacológicos completamente como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e ensaios que avaliem esses aspectos devem ser realizados futuramente.

Portanto, foi possível concluir que o complexo ou alguma forma ativa derivada dele está presente na corrente sanguínea dos animais, demonstrando dessa forma, que foi absorvido, uma vez que o tratamento com a presença de plasma inibiu o crescimento do *M. tuberculosis*. Assim, pode-se classificar $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ como oralmente biodisponível.

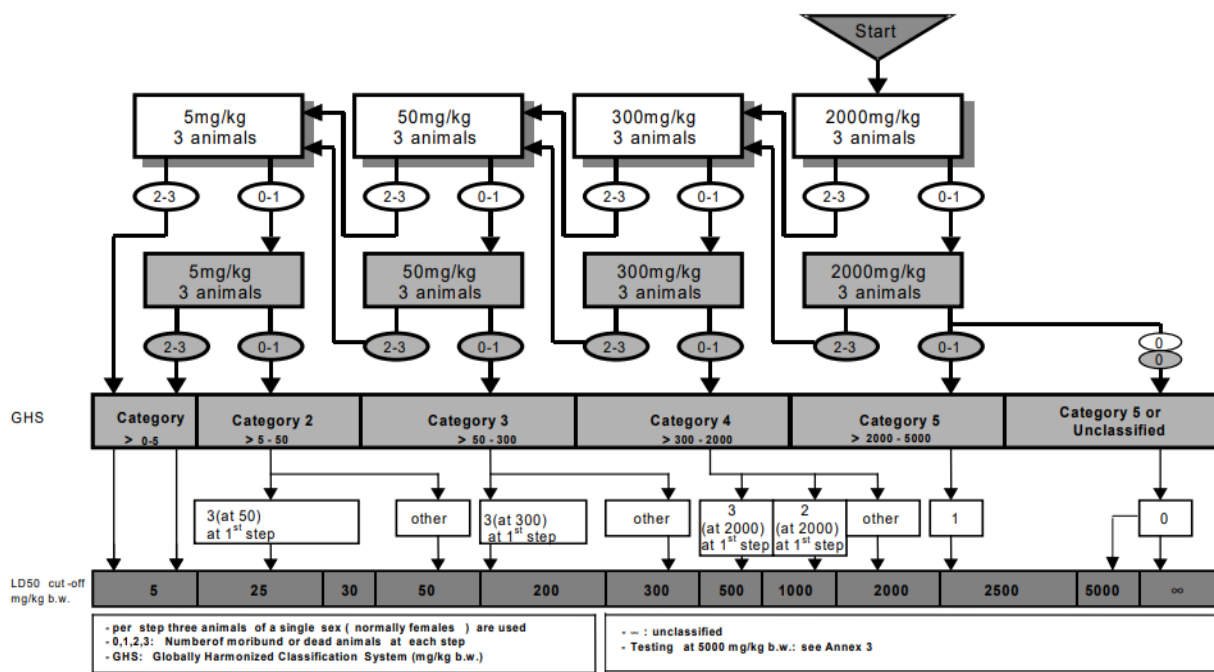
4.9 Avaliação da toxicidade aguda

Para a avaliação de toxicidade aguda do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, seguimos as especificações apresentados pelo manual da OECD (2001), demonstradas em forma de esquema na figura 14. Os agentes tóxicos via oral são classificados de acordo com o manual OECD como:

- Categoria 1 ($\text{DL}_{50} \leq 5 \text{ mg/kg}$): *Perigo - fatal se ingerido*;
- Categoria 2 ($5 \text{ mg/kg} < \text{DL}_{50} \leq 50 \text{ mg/kg}$): *Perigo - fatal se ingerido*;
- Categoria 3 ($50 \text{ mg/kg} < \text{DL}_{50} \leq 300 \text{ mg/kg}$): *Perigo - tóxico se ingerido*;

- Categoria 4 ($300 \text{ mg/kg} < \text{DL50} \leq 2.000 \text{ mg/kg}$): *Atenção - nocivo se ingerido e,*
- Categoria 5 ($2.000 \text{ mg/kg} < \text{DL50} \leq 5.000 \text{ mg/kg}$): *Atenção – pode ser perigoso se ingerido.*

Figura 14 – Procedimento de ensaio com dose inicial de 2.000 mg/Kg de peso corpóreo



Fonte: OECD (2001).

Após a administração em dose oral única (via gavagem) na concentração de 2.000 mg/Kg de peso corpóreo e observação dos animais por 14 dias, foram obtidos os seguintes resultados:

- *Controle negativo:* sobrevivência de 100% dos animais na concentração de 2.000 mg/kg de peso corpóreo.
- *Controle de veículo:* sobrevivência de 100% dos animais na concentração de 2.000 mg/kg de peso corpóreo.
- *Fármaco INH:* sobrevivência de 33,33% dos animais na concentração de 300 mg/kg de peso corpóreo. O ensaio foi repetido a 50 mg/kg de peso corpóreo, com sobrevivência de 100%.
- *Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$):* sobrevivência de 83,33% dos animais na concentração de 2.000 mg/kg de peso corpóreo.

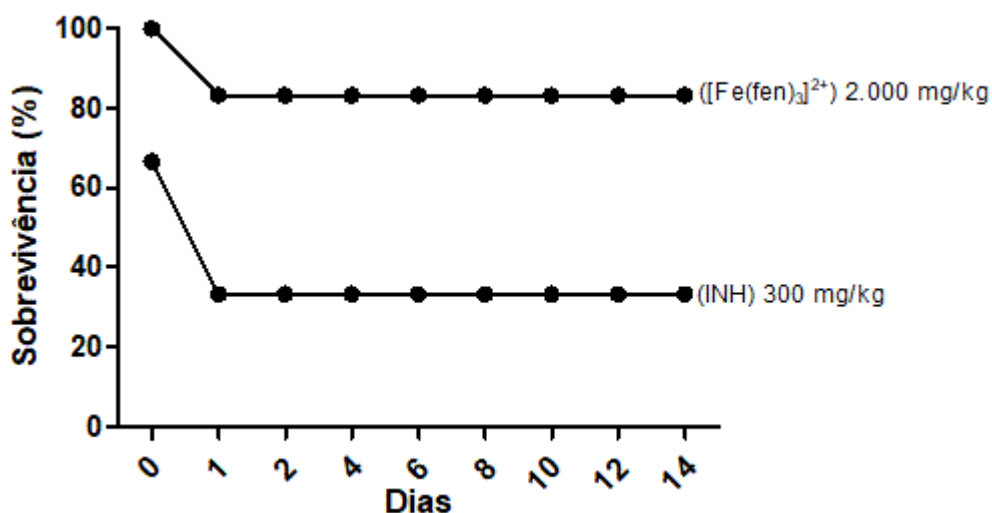
Não foram observadas mudanças comportamentais para os animais de nenhum grupo.

Os ensaios de avaliação de toxicidade aguda foram realizados em duplicata. No primeiro ensaio, o grupo que recebeu o complexo a 2.000 mg/kg de peso corpóreo do complexo não apresentou mortes de animais. Como é preconizado, o ensaio foi repetido na mesma concentração e, neste caso, ocorreu a morte de um animal integrante do grupo. Portanto, a dose

letal capaz de matar 50% da população estudada (DL50) foi superior à concentração de 2.000 mg/kg de peso corpóreo e o complexo é classificado como *Categoria 5*, ou seja, a menos tóxica. Esse é um resultado promissor, pois revela se tratar de uma molécula possivelmente segura para administração em pessoas, pois os riscos de uma intoxicação aguda são baixos. No entanto, mais estudos devem ser realizados para comprovar a segurança desse complexo como um estudo de toxicidade crônica ou um estudo de tolerabilidade *in vivo*, por exemplo.

O resultado dos ensaios está representado na figura 15 como taxas percentuais de sobrevivência dos animais durante os 14 dias de observação após a aplicação de dose única.

Figura 15 – Taxa de sobrevivência em ensaio de toxicidade aguda



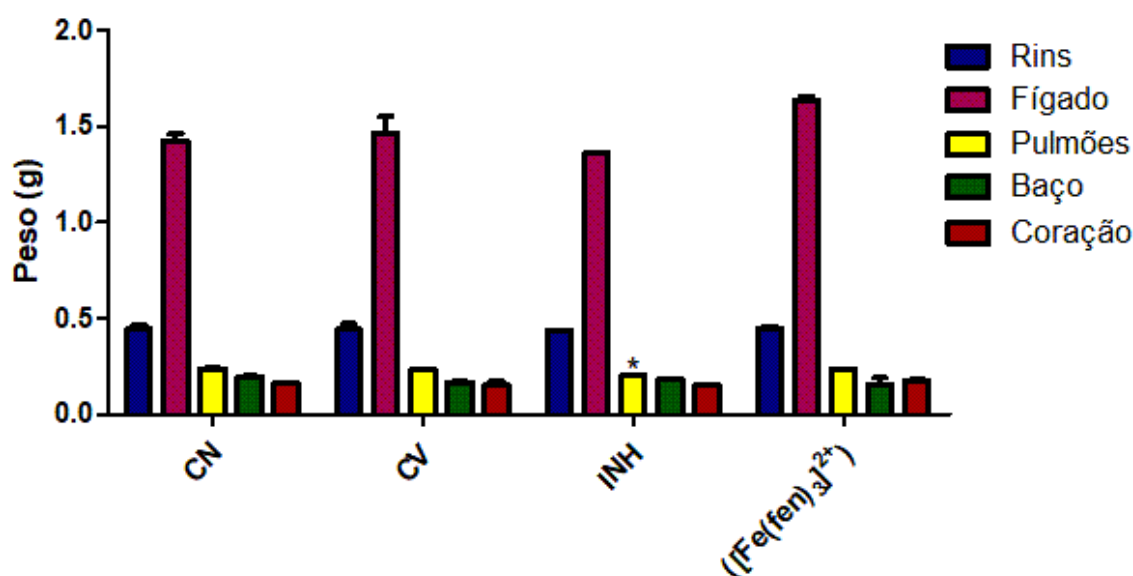
Resultados dos percentuais de sobrevivência de camundongos BALB/c após a aplicação de dose única via gavagem de 2.000 mg/kg de peso corpóreo do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e 300 mg/kg de peso corpóreo de isoniazida (INH).

O grupo que foi tratado com INH, recebeu o fármaco inicialmente a 300 mg/kg de peso corpóreo e 2 animais morreram de um total de 3. Então o ensaio foi repetido 2 vezes em uma concentração menor de 50 mg/kg de peso corpóreo e não houveram mortes. Dessa forma, a INH ficou caracterizada como categoria 3, que requer atenção quando ingerida, no entanto, os benefícios do fármaco superam os riscos.

O complexo frente aos estudos de toxicidade aguda se mostrou mais seguro que a INH, que é um medicamento importante utilizado na terapia anti-TB. No entanto, já é sabido que a INH pode causar hepatotoxicidade em pacientes susceptíveis, embora os mecanismos que levem a esse dano ainda não estejam completamente elucidados (HASSAN et al., 2015).

Ao final do período de observação, os animais foram eutanasiados e tiveram seus órgãos removidos, pesados e analisados macroscopicamente. Em nenhum caso foram observadas alterações morfológicas nos órgãos e não houve diferença estatística nos pesos com relação aos grupos controle, exceto para INH, que apresentou diminuição no peso dos pulmões (figura 16). Esses resultados são indicativos de que $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ não induziu alterações morfofisiológicas significativas, entretanto, não são suficientes para avaliar possíveis alterações em nível bioquímico.

Figura 16 - Peso de órgãos de camundongos BALB/c



Peso em gramas de órgãos de camundongos BALB/c após ensaio de toxicidade aguda. CN = controle negativo (água); CV = controle de veículo (microemulsão vazia); INH = isoniazida como fármaco controle. Análise estatística: Prisma 5.0, *one-way* ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. * = Diferença estatística encontrada em pesos de cada órgão comparado com o respectivo órgão do controle (CN).

4.10 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de parede celular

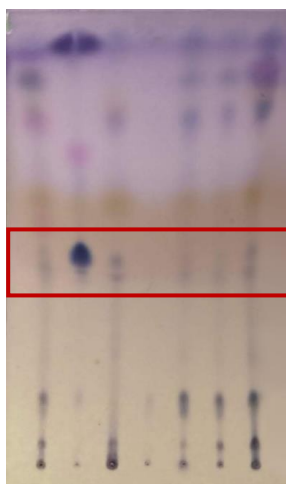
Para investigarmos se a inibição de síntese de parede celular poderia ser o mecanismo pelo qual o complexo age contra *M. tuberculosis*, realizou-se tratamentos frente cultivos de micobactérias com diferentes fármacos utilizados na terapia contra a TB e com o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, em questão. A figura 17 apresenta os resultados desse experimento, representados pela cromatografia em camada delgada (CCD) obtida após os tratamentos e extração de ácidos micólicos. Foram testados, da esquerda para a direita, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, padrão

de ácidos micólicos (controle positivo), RFP, INH, etionamida (ETA), ETB, e controle não tratado.

Durante o tratamento em cultivos de *M. tuberculosis* foram utilizadas concentrações do complexo e dos fármacos em 2x CIM₉₀, pois, em experimentos anteriores, não foi possível observar a inibição da síntese dos ácidos micólicos em culturas tratadas com os fármacos inibidores, INH, ETA e EMB.

Os valores de CIM₉₀ da RFP, INH e $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foram determinados experimentalmente pela metodologia do REMA apresentada anteriormente. Para os compostos EMB e ETA foram utilizados valores de CIM₉₀ encontrados na literatura, respectivamente 0,5 e 0,25 µg/mL (BRENNAN et al., 2008).

Figura 17 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)



Placa de Cromatografia em Camada Delgada (sílica gel) dos ácidos micólicos extraídos após tratamento. Da esquerda para direita: $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, padrão de ácidos micólicos, RFP, INH, ETA, EMB e controle não tratado. Revelador: anisaldeído sulfúrico (110 °C por 10 min). **Fonte:** Do autor.

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

Os ácidos micólicos, ácidos graxos ramificados de cadeia longa, estão presentes em micobactérias e são membros constituintes de sua parede celular, juntamente com peptidoglicano e arabinogalactano. Fármacos que agem em vias ligadas a síntese desses constituintes consequentemente interferem e inibem a síntese da parede celular (VASAVA et al., 2017).

O medicamento EMB inibe arabinosil transferases envolvidas na biossíntese de parede celular; ETA inibe a síntese de ácido micólico e a síntese de outros ácidos graxos de cadeia longa; e INH inibe a enzima InhA, responsável pela síntese de ácidos graxos que resultarão na biossíntese dos ácidos micólicos da parede celular (BRENNAN et al., 2008; ANDRADE et al., 2008).

Diante dos resultados obtidos na placa de cromatografia de cada amostra, podemos observar que não houve aparecimento de mancha para INH. Para EMB e ETA as manchas apareceram bem mais claras, comparadas com aquelas apresentadas pelo padrão (que contém os ácidos micólicos) e com o controle que não recebeu tratamento. Esses resultados eram esperados, devido ao mecanismo de ação que esses fármacos apresentam. Para essas amostras também é possível observar a diferença das manchas comparadas com RFP e $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$.

O aparecimento de manchas com Rf iguais ao padrão é bastante claro nas amostras de RFP, controle não tratado e o complexo. Esse perfil também era esperado para RFP, uma vez que não age em inibição de parede celular em micobactérias e para o controle que, não recebendo tratamento deveria manter os ácidos micólicos presentes normalmente.

Para as amostras onde foi testado o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, a mancha presente na CCD coincidente com o padrão, com o controle não tratado e com o fármaco RFP. Dessa maneira é possível sugerir que o complexo não é capaz de inibir a síntese de ácidos micólicos da parede celular de *M. tuberculosis*.

Consequentemente, esse resultado confirma o ensaio em latência apresentado no item 4.1 deste relatório, uma vez que $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ apresentou atividade contra bacilos não replicantes, e compostos que agem na inibição de síntese dos ácidos micólicos não são capazes de agir inibindo micobactérias em estado latente, como explicado anteriormente.

4.11 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a inibição de bomba de efluxo

Através do ensaio de acúmulo de brometo de etídio (BrEt), obtivemos os seguintes resultados apresentados na figura 18, expresso por curvas analíticas relativas a fluorescência intracelular do BrEt com relação ao tempo em *M. tuberculosis*. O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e o verapamil foram testados, ambos em concentração igual a $\frac{1}{2}$ CIM₉₀ e como controle, o cultivo de *M. tuberculosis* não tratado. Nesse ensaio também foram realizados outros controles, não

apresentados no gráfico, verificando a fluorescência emitida pelo PBS, PBS + BrEt, PBS + BrEt + verapamil e PBS + bactéria.

Figura 18 – Resultado do ensaio de acúmulo de BrEt

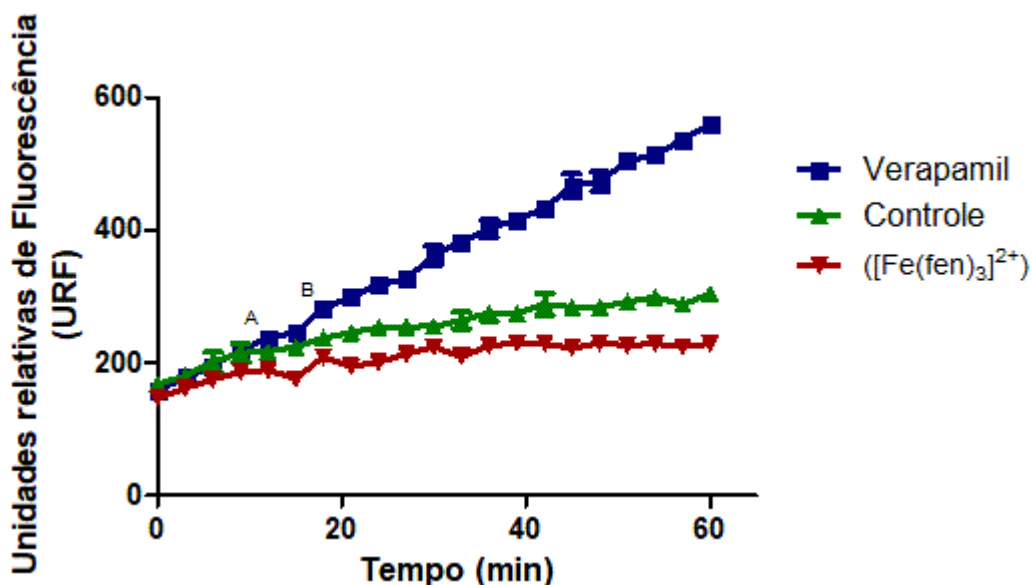


Gráfico da fluorescência relativa do brometo de etídio com relação ao tempo para avaliação da atividade com relação a inibição de bombas de efluxo. A = momento em que se inicia a diferença estatística significativa do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em relação ao verapamil (12 min); B = momento em que se inicia a diferença estatística significativa do controle não tratado em relação ao verapamil (18 min). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*.

M. tuberculosis apresenta múltiplas bombas de efluxo, caracterizadas como proteínas de membrana capazes de transportar ativamente uma ampla gama de compostos, incluindo fármacos. O efluxo de antimicrobianos através dessas bombas desempenha um papel importante que contribui para a resistência intrínseca e adquirida a medicamentos (SONG; WU, 2016; XU et al., 2018).

Nesse contexto, se destacam compostos que possam inibir a atividade de bombas, os chamados inibidores de bombas de efluxo, que, combinados com medicamentos anti-TB são capazes de aumentar a eficácia do fármaco, inibindo seu efluxo do ambiente intrabacilar. O verapamil, um composto antagonista do potencial eletroquímico transmembrana e de canais de cálcio possui a capacidade de inibir a atividade das bombas de efluxo presentes na membrana de *M. tuberculosis* (MACHADO et al., 2016; CANEZIN et al., 2018).

Dessa forma, utilizou-se verapamil como controle positivo, pois é conhecido por promover um aumento gradativo da fluorescência intracelular por aumento da concentração de BrEt em micobactérias, uma vez que está inibindo o efluxo do mesmo.

Analisando os resultados, podemos identificar a ação do verapamil pelo aumento de fluorescência de BrEt, pois está inibindo as bombas micobacterianas e assim impedindo seu efluxo. Verapamil apresenta estatisticamente diferença ao controle não tratado a partir de 18 minutos do início do experimento, pois no controle as bombas de efluxo estão em atividade normal, e consequentemente o efluxo de BrEt está ocorrendo. A fluorescência relativa final (RFF) do verapamil foi determinada utilizando-se a fórmula $(FR_{ensaio} - FR_{ref})/FR_{ref}$, onde obteve-se um valor de 0,842.

Quando analisamos no gráfico o resultado apresentado por $([Fe(fen)_3]^{2+})$, podemos identificar um perfil bastante semelhante ao controle não tratado, pois o complexo não apresenta aumento significativo em unidades relativas de fluorescência e estatisticamente a diferença em comparação ao verapamil aparece logo aos 12 minutos do ensaio. Dessa forma, fica claro que o complexo não inibe o efluxo de BrEt por bombas presentes em *M. tuberculosis* e não pode ser classificado como um inibidor de bombas de efluxo, portanto, esse possível mecanismo de ação não é manifestado por $([Fe(fen)_3]^{2+})$.

4.12 Investigação de possível mecanismo de ação relacionado a síntese de proteínas

Os ensaios que avaliaram um possível mecanismo de ação do complexo $([Fe(fen)_3]^{2+})$ relacionado com a inibição de síntese proteica foram realizados em *M. smegmatis*. Considerando que esse experimento representa uma nova metodologia para nosso laboratório, a escolha dessa espécie foi utilizada devido a sua propriedade de crescimento rápido comparado ao *M. tuberculosis*, porém, esse ensaio será aplicado em cepas *M. tuberculosis* em ensaios futuros.

Para se realizar a avaliação de mecanismo de ação foi necessário primeiramente determinarmos a CIM₉₀ do complexo e de fármacos controle frente a cepa *M. smegmatis* (Tabela 8). A CIM₉₀ de $([Fe(fen)_3]^{2+})$ foi de 4,8 µg/mL, valor bastante próximo daquele encontrado como CIM₉₀ frente *M. tuberculosis* (5,321 µg/mL).

Tabela 8 - Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas de *M. smegmatis* mc²155 (ATCC 700084). Valores apresentados como média (M) $\pm$ desvio padrão (DP) de três ensaios independentes.

Moléculas	CIM ₉₀ (µg/mL)
([Fe(fen) ₃] ²⁺)	4,8 $\pm$ 1,2
INH	4,7 $\pm$ 0,94
RFP	2,4 $\pm$ 1,03
STR	0,4 $\pm$ 0,2

Fármacos: INH = isoniazida; RFP = rifampicina; STR = estreptomicina.

Após determinarmos a CIM₉₀ frente a cepas de *M. smegmatis*, procedemos com o ensaio que buscou avaliar o complexo como um possível inibidor de síntese de proteínas bacteriana.

Os bacteriófagos são vírus capazes de lisar seu hospedeiro bacteriano. Eles são específicos para as bactérias através do reconhecimento das proteínas da superfície a partir das quais infecta, possuem autoprolicação rápida e ampla disponibilidade. Descobriu-se em 1954 que micobacteriófagos podiam infectar bacilos patogênicos de crescimento lento da espécie *M. tuberculosis*, denominados D29 (DAVID et al., 1980; MCNERNEY; TRAORÉ, 2005; O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009). O ciclo de replicação de bacteriófagos pode fornecer informações sobre os respectivos modos de ação de alguns fármacos. O estudo dos efeitos de compostos sobre o crescimento de bacteriófagos pode ser usado com sucesso para pesquisar compostos que agem na estrutura e função do ácido desoxirribonucleico e na maquinaria sintética proteica (DAVID et al., 1980).

Por essas razões, a utilização de micobacteriófagos na pesquisa de novos fármacos contra a TB é uma ferramenta bastante eficaz, buscando moléculas promissoras que possam estar relacionadas à inibição de síntese proteica das micobactérias.

Os fagos D29 são capazes de utilizar a maquinaria de síntese proteica das micobactérias para se multiplicar, nesse processo é possível a observação de Unidades Formadoras de Placas (UFP) em meio de cultura sólido em laboratório (Figura 19). Quando uma UFP fago é formada, isso indica que uma bactéria viável capaz de realizar síntese proteica foi lisada por um fago, porém, se a via bacteriana de síntese de proteína está inibida, consequentemente o fago não irá realizar seu ciclo lítico nessa bactéria, não irá se multiplicar e então não serão visualizadas UFPs em placas de meio de cultura.

Figura 19 - Placa de meio de cultura sólido com Unidades Formadoras de Placas (UFP)

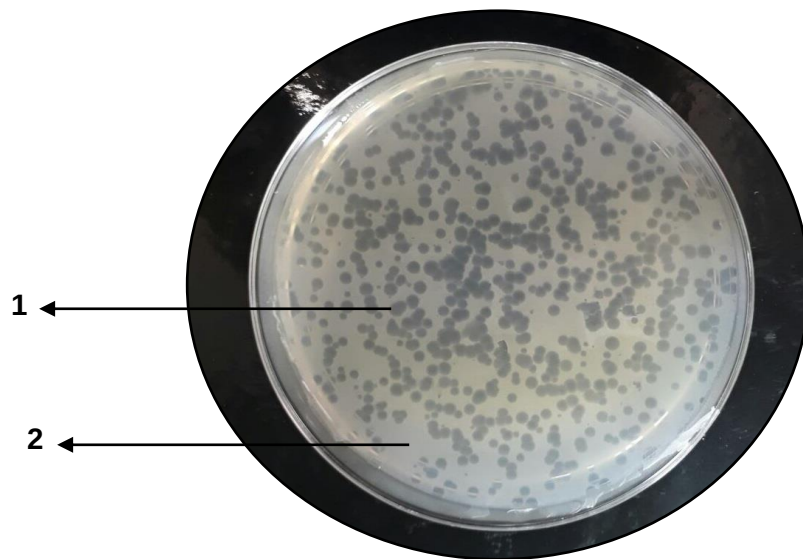
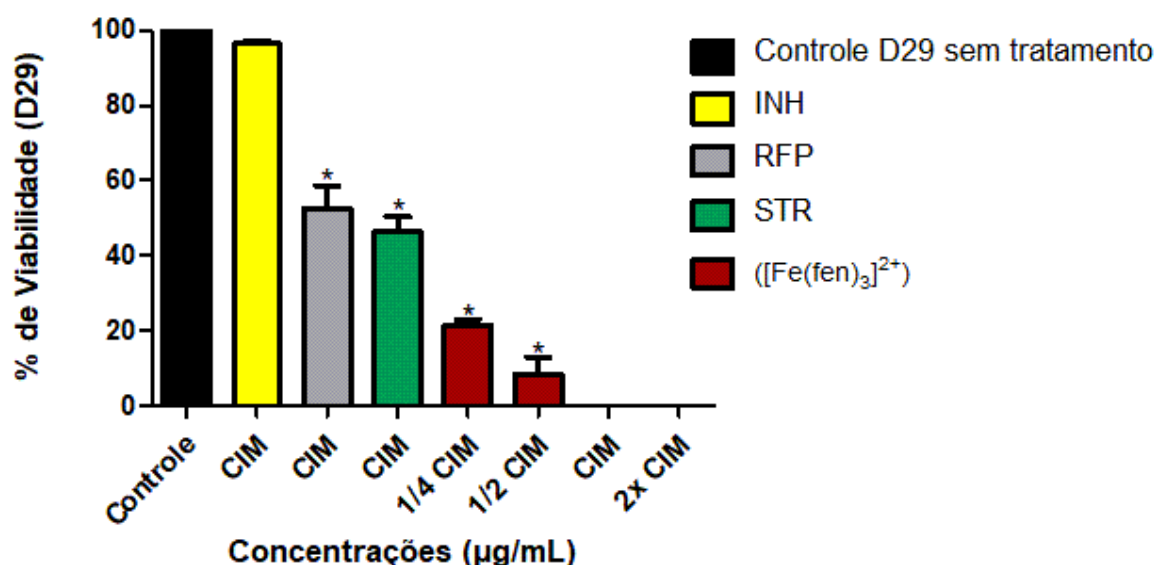


Imagem de uma placa de meio sólido contendo cultivo celular de *M. Smegmatis* (exemplificado em 2) e unidades formadoras de placas (UFP) de micobacteriófagos D29 (exemplificado em 1). **Fonte:** Do autor.

Seguindo esse raciocínio o ensaio foi realizado. Concentrações do complexo (1/4x CIM, 1/2x CIM, 1xCIM e 2xCIM) e fármacos controle nas concentrações de CIM foram testados. As micobactérias foram tratadas com essas moléculas e incubadas juntamente com fagos D29, um controle sem tratamento também foi realizado em cada ensaio nas mesmas condições. Após a incubação, as UFPs foram contadas e foi calculado a porcentagem de inibição de micobacteriófagos em comparação com o controle positivo.

Os resultados desse ensaio estão demonstrados na figura 20, a seguir. As placas onde foram testados o fármaco INH na concentração da CIM a inibição de D29 foi quase nula comparado com as placas sem tratamento, já com os fármacos RFP e STR nos valores de CIM, a inibição no crescimento de fagos foi em torno de 48% e 54% respectivamente. Quando o complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) foi testado a inibição em UFP visualizada foi em torno de 79% na concentração de 1/4 da CIM, 91% em metade da CIM e nos valores de CIM e 2x CIM houve inibição total do crescimento de micobacteriófagos, não sendo possível visualizar UFP.

Figura 20 – Investigação da inibição de síntese proteica micobacteriana



Resultados da investigação de possível mecanismo de ação apresentado pelo complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ relacionado a síntese de proteínas. O gráfico representa a porcentagem crescimento (viabilidade) de micobacteriófagos D29 em placas de meio sólido frente a diferentes tratamentos e sem tratamento (controle). CIM = Concentração Inibitória Mínima frente a *M. smegmatis*. INH = isoniazida; RFP = rifampicina; STR = estreptomicina. Análise estatística: Prisma 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes. * = Diferença estatística encontrada em valores de CIM comparadas ao controle.

A inibição de UFP indica que as bactérias presentes naquele ensaio apresentam de alguma forma inibição de síntese proteica, por isso os micobacteriófagos não conseguem lisar essas bactérias e não formam UFP.

A INH foi utilizada nesse ensaio como um controle negativo, pois seu mecanismo de ação é a inibição de síntese de ácidos micólicos. Como esperado por não interferir com a síntese de proteínas, as placas tratadas com INH não apresentaram inibição no crescimento de micobacteriófagos.

STR e RFP foram utilizadas como controle positivo, uma vez que STR ao se ligar aos componentes da subunidade 30S do ribossomo bacteriano bloqueia a tradução, inibindo assim a síntese proteica. A RFP inibe a transcrição gênica da micobactéria por bloqueio da RNA polimerase DNA dependente, o que impede a síntese de RNA mensageiro (*RNA_m*) e de proteína pelo bacilo, produzindo morte celular (DOOKIE et al., 2018). As placas tratadas com esses fármacos na concentração de CIM apresentaram aproximadamente 50% de inibição de UFP, indicando dessa forma que as bactérias ali presentes estavam com seu mecanismo de síntese proteica afetado, consequentemente interferindo com o crescimento de fagos.

Quando o complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) foi testado em diferentes concentrações de CIM, foi possível observar formação de reduzidas UFP apenas em concentrações mais baixas do complexo. Diante desses resultados podemos considerar um possível mecanismo de ação para o complexo relacionado com inibição de síntese proteica em micobactérias, já que a inibição de crescimento de fagos foi dependente da concentração do complexo.

4.13 Seleção e isolamento das cepas resistentes de *M. tuberculosis*

Para selecionarmos cepas espontaneamente resistentes ao complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) e procedermos com o isolamento de um mutante foi necessário determinarmos previamente a CIM do complexo em meio sólido Middlebrook 7H11.

A seleção de mutantes resistentes a uma molécula está fortemente associada à atividade dessa molécula frente ao microrganismo, ou seja, a concentração na qual o composto permeia a célula e se liga ao alvo. Para isolar mutantes resistentes, a CIM em meio sólido de uma molécula alvo é determinada primeiro, para que se possa caracterizar como uma bactéria resistente aquela capaz de crescer em concentrações iguais ou maiores da CIM, a qual tinha-se estabelecido como inibição de crescimento (PARISH; ROBERTS, 2015).

De acordo com SIRGEL et al. (2009), o valor de CIM₉₉ em meio sólido para uma determinada molécula pode variar em até 10 vezes quando comparado com o meio líquido, devido a variáveis, como a cinética de crescimento bacteriano em meio sólido e também por haver diferenças em relação a superfície de contato entre a bactéria e a molécula testada nesses meios.

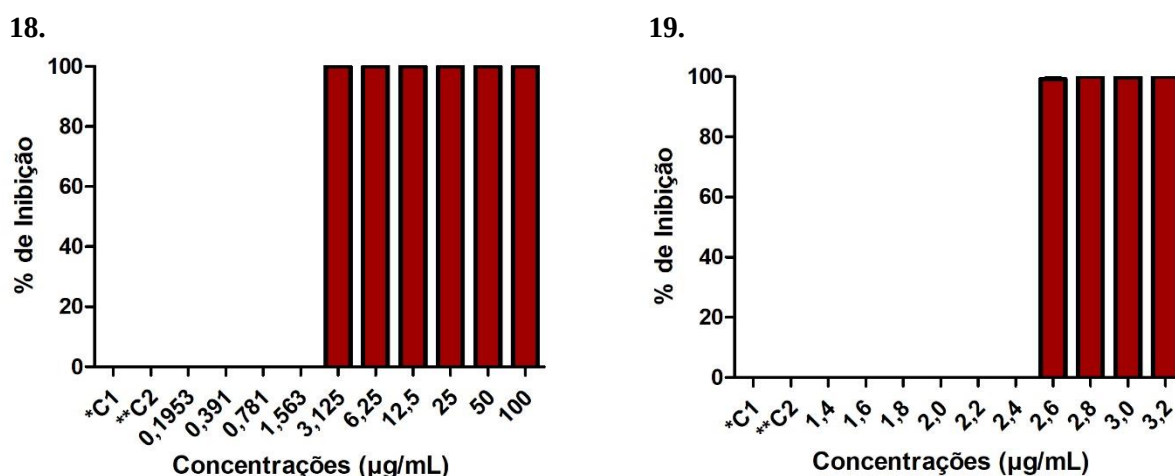
Portanto, para os testes de determinação de CIM₉₉ em meio sólido foi utilizada uma concentração inicial do complexo de 100 µg/mL seguida de mais 9 diluições na proporção de 1:2 até a concentração final de aproximadamente 0,2 µg/mL. Ao final do período de incubação das placas, foi feita a contagem das colônias e os valores de UFC/mL foram convertidos em valores relativos de porcentagem de inibição, na qual o valor mínimo de inibição de crescimento, ou seja, 0% foi aquele obtido para os controles do experimento nos quais não se utilizou o complexo e o valor máximo de inibição (100%) foi aquele em que não houve crescimento de colônias. Os valores de concentração de ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) testados e a porcentagem de inibição de UFC em meio sólido diante dessas concentrações estão representados na figura 21.

Com os resultados expressos na figura 21, é possível observar que não houve inibição do crescimento de micobactérias até a concentração de 1,563 $\mu\text{g/mL}$, onde foi observado crescimento equiparável ao controle. Partindo da concentração de 3,125 $\mu\text{g/mL}$ a inibição de crescimento foi de 100%. Diferentemente do esperado, a concentração mínima capaz de inibir 99% do crescimento do *M. tuberculosis* em meio sólido para o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi inferior ao valor obtido em meio líquido. No intuito de se obter um valor de MIC_{99} mais preciso, o experimento foi refeito utilizando-se concentrações intermediárias à maior concentração na qual houve crescimento bacteriano (aproximadamente 1,4 $\mu\text{g/mL}$) e à menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano (aproximadamente 3,2 $\mu\text{g/mL}$) e os resultados obtidos estão representados na figura 22.

Diante desses resultados, é possível observar que até a concentração de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ não houve inibição de crescimento e a partir de 2,6 $\mu\text{g/mL}$ a inibição foi máxima sem mostrar um aumento gradativo. Portanto, o valor de CIM_{99} do complexo em meio sólido frente ao *M. tuberculosis* H₃₇Rv foi estabelecido como 2,6 $\mu\text{g/mL}$, o qual foi utilizado nos experimentos seguintes de isolamento e frequência de mutantes resistentes ao complexo.

Este valor encontrado fortalece a ideia de que $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é potente contra o *M. tuberculosis* diante ensaios *in vitro*, pois foi necessária uma concentração baixa para inibir o crescimento de até 99% dessa bactéria em meio sólido.

Figuras 21 e 22 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM_{99}) de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente *M. tuberculosis* H₃₇Rv em meio sólido.



Porcentagem de inibição do crescimento de *M. tuberculosis* frente a diferentes concentrações de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em meio sólido Middlebrook 7H11. *C1 = controle de crescimento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv na concentração 10⁵ UFC/mL; **C2 = controle de crescimento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv na concentração 10³ UFC/mL.

Durante os ensaios para determinação do valor de CIM₉₉ em meio de cultura sólido, foram obtidas algumas colônias de *M. tuberculosis* que cresceram em concentrações acima ou igual à CIM₉₉ (Tabela 9). Essas colônias foram coletadas na tentativa de se proceder com o ensaio de isolamento de cepas espontaneamente resistentes ao complexo.

Tabela 9 - Quantidade de UFC encontradas em concentrações iguais ou superiores ao CIM₉₉

	Concentração do complexo ([Fe(fen) ₃] ²⁺)	
	3,0 µg/mL	2,6 µg/mL
Número de UFC	1	7

UFC = Unidades Formadores de Colônias de *M. tuberculosis*.

Primeiramente essas colônias foram semeadas em placas de meio sólido contendo o composto na mesma concentração em que foram obtidas para garantir que elas são capazes de sobreviver em tal condição. Uma vez que as bactérias cresceram nessas placas iniciais, elas foram semeadas em placas contendo o dobro da concentração do complexo e assim passando sucessivamente para placas contendo concentrações maiores com a finalidade de se confirmar a resistência ao complexo, e obter um mutante resistente a ([Fe(fen)₃]²⁺). Os resultados de isolamento de bactérias resistentes e crescimento em concentrações maiores do complexo estão representados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Isolamento de *M. tuberculosis* com crescimento na concentração de 3,0 µg/mL em meio sólido 7H11.

	Concentrações do complexo ([Fe(fen) ₃] ²⁺) em µg/mL			
	3,0	6,0	9,0	24
UFC: R1 ^a	+	+	+	-

R1^a = UFC (Unidade Formadora de Colônia) encontradas em concentração de 3,0µg/mL do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺); (+) = crescimento bacteriano; (--) sem crescimento bacteriano.

Tabela 11 - Isolamento de *M. tuberculosis* com crescimento na concentração de 2,6 µg/mL em meio sólido 7H11.

UFC	Concentração do complexo ([Fe(fen) ₃] ²⁺) em µg/mL			
	2,6	5,2	10,4	20,8
R1^b	+	+	+	-
R2^b	+	+	+	-
R3^b	+	+	+	-
R4^b	+	+	-	-
R5^b	+	+	+	-
R6^b	+	+	+	-
R7^b	+	+	+	-

R1^b a R7^b = UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) encontradas em concentrações de 2,60 µg/mL do complexo ([Fe(fen)₃]²⁺); (+) = crescimento bacteriano; (-) sem crescimento bacteriano.

De acordo com os resultados expostos na tabela 10 podemos observar que a UFC (R1^a) apresentou crescimento na concentração do complexo até 3 vezes maior à qual foi encontrada (9,0 µg/mL), que corresponde a aproximadamente 3,5 vezes o valor da CIM₉₉. Porém na concentração de 24,0 µg/mL já não houve aparecimento de UFCs.

Na tabela 11 podemos observar que as colônias isoladas a partir da concentração da CIM₉₉ do complexo (R1^b a R7^b) foram semeadas sucessivamente para placas com concentrações do complexo 2, 4 e 8 vezes superiores, mas só foram capazes de crescer até o valor de 4 vezes a CIM₉₉ (10,4 µg/mL), com exceção da colônia R4^b, que cresceu até 2 vezes a CIM₉₉.

Entre as bactérias que conseguem crescer em concentrações maiores de CIM provavelmente apresentam mutações mais estáveis e que não passam por processos de reparo capazes de reverter essas mutações. Foi observado nesse ensaio que a exposição ao complexo na concentração de 8 vezes ou mais da CIM₉₉ impediu o crescimento de todas as UFCs, representando um valor limítrofe para o isolamento de mutantes resistentes de *M. tuberculosis* ao complexo ([Fe(fen)₃]²⁺).

Todas as colônias que cresceram em concentrações do complexo 2 vezes a CIM ou superiores foram transferidas para o meio líquido Middlebrook 7H9 para se obter multiplicação e formação de inóculo, posteriormente esse inóculo passou por processos de lavagem e centrifugação, os quais permitiram que as bactérias fossem congeladas em criotubos e mantidas

a temperatura de -80°C para serem utilizadas nos experimentos futuros de caracterização de resistência.

No caso das colônias que cresceram em concentrações de 4 vezes a CIM, essas foram transferidas para meio líquido e estão sendo cultivadas nessas mesmas concentrações em placas, para confirmação de resistência. Além disso, essa etapa está sendo realizado com o intuito de obtermos replicatas (clones resistentes) para que se possa proceder com o processo de caracterização de resistência através do sequenciamento genômico dessas bactérias resistentes ao complexo ([Fe(fen)₃]²⁺).

A resistência a fármacos em *M. tuberculosis* é geralmente mediada por mutações cromossômicas que modificam o local de ligação do fármaco ao alvo, ou então mutações em enzimas bacterianas que ativam pró-fármacos. As mutações nas proteínas da membrana que conduzem à diminuição da permeabilidade ou aumento da expressão de bombas de efluxo são outros mecanismos pelos quais *M. tuberculosis* pode adquirir resistência aos medicamentos (WALKER, ; SUN et al., 2014).

Os ensaios de isolamento e caracterização de mutantes resistentes têm sido utilizados para identificar diversos mecanismos de resistência. O DNA genômico é preparado a partir de pelo menos três clones resistentes e analisado por sequenciamento de todo o genoma. Se as mutações observadas em todos os três mutantes forem localizadas em um determinado gene ou operon, é altamente sugerido que o gene/ operon em questão seja o alvo ou mecanismo de ação de uma determinada molécula (WALKER, ; IOERGER et al., 2013).

A metodologia de isolamento de cepas resistentes ao complexo foi realizada de forma que as colônias resistentes foram sendo semeadas gradativamente para concentrações maiores do complexo e dessa forma foi possível o isolamento de um possível mutante, partindo-se inicialmente de um cultivo de micobactérias de aproximadamente 10⁹ UFC/mL.

Já no ensaio de determinação de frequência de resistência, a metodologia aplicada, trata-se de partirmos de um cultivo bacteriano de aproximadamente 3,5 x 10⁷ UFC/mL, que foi semeado em placas de meio sólido com concentrações crescentes do complexo (1x, 2x, 4x e 8x CIM) em um mesmo tempo e depois determina-se com qual frequência houve crescimento de colônias resistentes. Nessa última metodologia, não foi observado crescimento de colônias em nenhuma concentração testada do complexo, não sendo possível determinarmos a frequência

exata com que ocorrem para $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$). Dessa forma podemos prever que a frequência de mutações em *M. tuberculosis* H₃₇Rv frente ao complexo é inferior a $3,5 \times 10^{-7}$.

A frequência de mutações em *M. tuberculosis* conhecida e expressa na literatura para o fármaco RFP é entre 10^{-7} e 10^{-8} mutantes resistentes e a bedaquilina, medicamento aprovado mais recentemente para tratar TB resistente, também apresenta aproximadamente essa mesma taxa, sendo que foi encontrado a proporção de 5×10^{-8} mutantes resistentes. Já, o fármaco INH apresenta um frequência de resistência maior na faixa de 10^{-6} (ANDRIES et al., 2005; SEIFERT et al., 2015).

Dessa maneira, a taxa de frequência de mutação de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ por ser menor que $3,5 \times 10^{-7}$ é um resultado que colabora positivamente para o estudo desse complexo, uma vez que é uma proporção de resistência comparável com medicamentos utilizados na tratamento da TB, expressando uma possibilidade baixa de se encontrar um resistente ao complexo, pensando principalmente em relação a terapia.

4.14 Avaliação do potencial mutagênico

O ensaio de micronúcleo foi realizado para avaliarmos se o complexo pode exibir potencial de mutagenicidade *in vitro*. Esse ensaio tem despontado como um dos métodos mais utilizados para avaliação de danos cromossomais, pois permitem que a perda e a quebra cromossômica sejam medidas de forma confiável (FENECH, 2000). É considerado um ponto final para a avaliação de danos cromossômicos causados por diferentes mutágenos tanto *in vitro* como *in vivo* (GARAJ-VRHOVAC; GAJSKI; RAVLIĆ, 2008). Os micronúcleos (MNI) são originários de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que se atrasam durante a etapa de anáfase da divisão nuclear (Figura 23). São morfologicamente idênticos aos núcleos com variando entre 1/16 e 1/3 do diâmetro médio dos núcleos principais (FENECH, 2011).

Figura 23 – Célula binucleada com micronúcleo

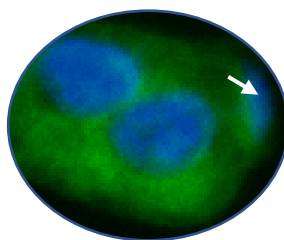
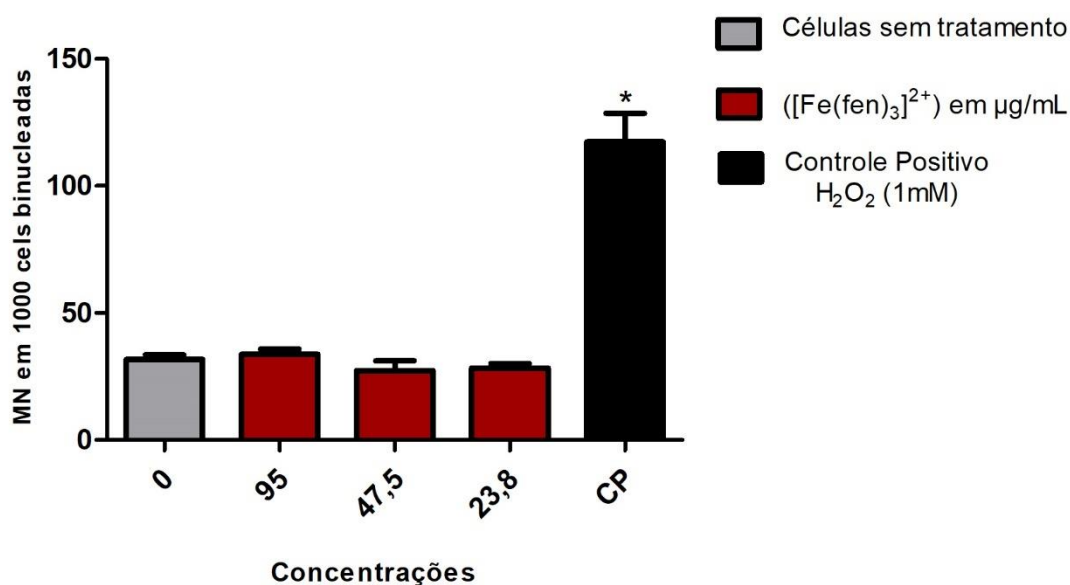


Imagem representativa de uma célula HepG2 binucleada com micronúcleo (seta) corado com *Hoechst* 33342 (azul) e FITC (verde). Aumento 20X. Fonte: Foto cedida pela Dra. Isabel Silva – Laboratório de Pesquisa em Tuberculose da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp.

No presente estudo, a formação de micronúcleo foi avaliada na linhagem HepG2 tratadas com o complexo em três concentrações abaixo do IC₅₀ (valor predeterminado em ensaios de citotoxicidade). Os resultados obtidos estão apresentados na figura 24 e mostram que o complexo claramente não induziu formação de micronúcleo (MN) em quantidades significativas quando comparados ao controle negativo (0, sem tratamento), sendo então considerado não mutagênico por este teste.

O estudo de avaliação mutagênica de moléculas com atividade biológica mostra-se de grande importância, pois, embora muitos compostos tenham atividades farmacológicas consideráveis, algumas propriedades indesejáveis, tais como a mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade podem limitar a sua utilização como agente terapêutico. Dessa forma, o complexo por não exibir potencial mutagênico nesse teste, representa um perfil bastante benéfico, fornecendo subsídios às futuras pesquisas clínicas (OLIVEIRA, 2013).

Figura 24 - Avaliação da mutagenicidade através de ensaios de micronúcleo *in vitro*



A figura representa o número de células binucleadas com Micronúcleo (MN) por 1000 células binucleadas em células HepG2 após exposição com $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. One-way ANOVA com pós teste de *Dunnett*. * = Diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo controle (0). CP = H_2O_2 : 1 mM foi usada como controle positivo.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos através desse trabalho podemos caracterizar o complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) como um promissor candidato à fármaco para tratamento da TB. Através das metodologias aplicadas para se avaliar a atividade do complexo frente ao *M. tuberculosis* foi possível determinar uma eficaz atividade contra micobactérias sensíveis em diferentes condições de meio de cultura. $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ apresentou atividade em bacilos no estado não-replicante, caracterizado como TB latente; foi ativo em cepas com perfis de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da doença. Além disso apresentou ótima inibição de bacilos intracelulares comparável a RFP, fármaco de primeira linha do tratamento da TB.

O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ apresentou um perfil não mutagênico em ensaios de micronúcleo e baixa citotoxicidade frente as linhagens de células testadas (macrófagos J774A.1, fibroblastos MRC-5 e hepatócitos HepG2), exibindo um favorável índice de seletividade contra *M. tuberculosis*. Demonstrou também ter um espectro estreito de ação, sendo específico na inibição de micobactérias.

Na investigação de possíveis mecanismos de ação de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em inibir o *M. tuberculosis* podemos classificá-lo como potencial inibidor de síntese proteica micobacteriana, não excluindo a possibilidade de outras vias e outros alvos de inibição do bacilo. A seleção de cepas mutantes resistentes ao complexo está em execução para sequenciamento e identificação das mutações, a fim de se determinar de forma mais específica qual o(s) alvo(s) que $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ atinge para inibir os bacilos.

No ensaio em que investigamos o perfil de biodisponibilidade oral, o complexo demonstrou após 2h de sua aplicação estar biodisponível nos plasmas dos animais tratados e apresentou pico na concentração plasmática em 6h.

Portanto, os resultados em relação a atividade de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ contra o *M. tuberculosis* foram satisfatórios. Considerando que a doença da TB apresenta formas peculiares e distintas de patogênese sendo muitas vezes de difícil tratamento, uma molécula que atue nessas formas, seja de baixo custo e fácil acesso, desperta interesse direcionado ainda maior no avanço da investigação de segurança e eficácia, a fim de classificá-la como um promissor fármaco que possa ajudar no controle e tratamento dessa doença mundialmente disseminada.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, M. A.; SALAMA, I.; GOMAA, M. S.; ELAASSER, M. M.; ABDEL-AZIZ, M. M.; SOLIMAN, D. H. Design, synthesis and 2D QSAR study of novel pyridine and quinolone hydrazone derivatives as potential antimicrobial and antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 698–714, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.004>>.
- ANDRADE, C. H.; PASQUALOTO, K. F. M.; ZAIM, M. H.; FERREIRA, E. I. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 167–179, 2008.
- ANDRESEN, V.; GJERTSEN, B. T. Drug Repurposing for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Medicine**, v. 4, n. 211, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00211/full>>.
- ANDRIES, K.; NEEFS, J.; WINKLER, H.; GESTEL, J. Van; TIMMERMAN, P.; ZHU, M.; LEE, E.; WILLIAMS, P.; CHAFFOY, D. De; HUITRIC, E.; HOFFNER, S.; CAMBAU, E.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LOUNIS, N.; JARLIER, V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, n. 223, p. 222–227, 2005.
- ANKRAH, A. O.; GLAUDEMANS, A. W. J. M.; MAES, A.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R. A. J. O.; VORSTER, M.; SATHEKGE, M. M. Tuberculosis. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 48, n. 2, p. 108–130, 2017.
- ARBEX, M. A. VARELLA, M. C. L.; SIQUEIRA, H. R.; DE MELLO, F. A. F. Artigo de Revisão: Drogas antituberculose: interações, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte I: Fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 626–640, 2010.
- AZMI, A. S. Network pharmacology for cancer drug discovery: are we there yet? **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 939–941, 2012. Disponível em: <<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.12.44>>.
- BARTLETT, J. G. Tuberculosis and HIV Infection: Partners in Human Tragedy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. s1, p. 124–125, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/518668>>.
- BELLÉR, G.; LENTE, G.; FÁBIÁN, I. Central role of phenanthroline mono-N-oxide in the decomposition reactions of tris(1,10-phenanthroline)iron(II) and iron(III) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 3968–3970, 2010.
- BENCINI, A.; LIPPOLIS, V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 17–18, p. 2096–2180, 2010.
- BOTTEGA, F.C.; OLIVEIRA, M.R.L.; RUBINGER, M.M.M.; BELLATO, C.R.; ARDISSON, J.D.; ZAMBOLIM, L. Sais de tetrafenilfosfônio e tris (1,10fenantrolina)ferro(II) de complexos aniônicos de dibutilenstanho(IV) com ditiocarbimatos: síntese, caracterização e

atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 554-560, 2016.

BRANDT, W. W.; DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C. Chelate Complexes of 1,10-phenanthroline and related compounds. **Department of Chemistry, University of Sydney**, 34 p., 1954.

BREITKREITZ, M. C.; DE SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com orto-fenantrolina. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

BRENNAN, P. J. YOUNG, D. B.; ROBERTSON, B. D. Handbook of Anti-Tuberculosis Agents (Tuberculosis). **Global Alliance for TB Drug Development - Elsevier Health**, v. 88, n. 2, p. 85-170, 2008.

BUTLER, H. M.; HURSE, A.; THURSKY, E.; SHULMAN, A. Bactericidal Action of Selected Phenanthroline Chelates and Related Compounds. **The Australian Journal of Experimental Biology Medical**, v. 47, n. 5, p. 541-552, 1969. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/icb.1969.148>>.

CAILLEAUX-CEZAR, M. Diagnosis and Treatment of Latent Tuberculosis. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 41-45, 2012.

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; AMARAL, R. C. R.; DEMITTO, F. O.; MALTEMPE, F. G.; CANEZIN, P. H.; SCODRO, R. B. L.; NAKAMURA, C. V.; LEITE, C. Q. F.; SIQUEIRA, V. L. D.; CARDOSO, R. F. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. **Tuberculosis**, v. 97, p. 65-72, 2016.

CANEZIN, P. H.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; SCODRO, R. B. L.; SIQUEIRA, V. L. D.; PAVAN, F. R.; BARROS, I. L. E.; CARDOSO, R. F. Intramacrophage *Mycobacterium tuberculosis* efflux pump gene regulation after rifampicin and verapamil exposure. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1770-1776, 2018.

CHAUDHARI, K.; SURANA, S.; JAIN, P.; PATEL, H. M. *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) GyrB inhibitors: An attractive approach for developing novel drugs against TB. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 160-185, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.034>>.

CHIN, K. L.; ANIS, F. Z.; SARMIENTO, M. E.; NORAZMI, M. N.; ACOSTA, A. Role of Interferons in the Development of Diagnostics, Vaccines, and Therapy for Tuberculosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 10 p., 2017.

CHO, S. H.; WARIT, S.; WAN, B.; HWANG, C. H.; PAULI, G. F.; FRANZBLAU, S. G. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1380-1385, 2007.

CITRON, K. M.; ANGEL, J. H.; CAMPBELL, I. A. Short course chemotherapy in pulmonary tuberculosis. A controlled trial by the British Thoracic and Tuberculosis Association. **The Lancet**, v. 2, n. 7995, p. 1102-1104, 1976.

COYLE, B.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; GERAGHTY, M. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu (II), Mn (II) and Ag (I) complexes. **BioMetals**, v. 16, p. 321–329, 2003.

COYLE, B.; KINSELLA, P.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; O'CONNOR, R.; CLYNES, M.; KAVANAGH, K. Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 63–70, 2004.

DA SILVA, P. E. A.; PALOMINO, J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and new drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1417–1430, 2011.

DAVID, H. L.; CLAVEL, S.; CLEMENT, F.; MONIZ-PEREIRA, J. Effects of antituberculosis and antileprosy drugs on mycobacteriophage D29 growth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 2, p. 357–359, 1980.

DE FREITAS, E. S.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; BATISTA, A. A.; DE OLIVEIRA LOPES, É.; DA SILVA, M. M.; LEITE, C. Q. F.; PAVAN, F. R. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in Vitro cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5999–6008, 2014.

DEVASUNDARAM, S.; KHAN, I.; KUMAR, N.; DAS, S.; RAJA, A. The influence of reduced oxygen availability on gene expression in laboratory (H37Rv) and clinical strains (S7 and S10) of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 70–80, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.017>>.

DHEDA, K.; GUMBO, T.; MAARTENS, G.; DOOLEY, K. E.; MCNERNEY, R.; MURRAY, M.; FURIN, J.; NARDELL, E. A.; LONDON, L.; LESSEM, E.; THERON, G.; VAN HELDEN, P.; NIEMANN, S.; MERKER, M.; DOWDY, D.; VAN RIE, A.; SIU, G. K. H.; PASIPANODYA, J. G.; RODRIGUES, C.; CLARK, T. G.; SIRGEL, F. A.; ESMAIL, A.; LIN, H. H.; ATRE, S. R.; SCHAAF, H. S.; CHANG, K. C.; LANGE, C.; NAHID, P.; UDWADIA, Z. F.; HORSBURGH, C. R.; CHURCHYARD, G. J.; MENZIES, D.; HESSELING, A. C.; NUERMBERGER, E.; MCILLERON, H.; FENNELLY, K. P.; GOEMAERE, E.; JARAMILLO, E.; LOW, M.; JARA, C. M.; PADAYATCHI, N.; WARREN, R. M. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. **The Lancet Respiratory Medicine Commission**, v. 5, n. 4, p. 291–360, 2017.

DHOLARIYA, H. R.; PATEL, K. S.; PATEL, J. C.; PATEL, K. D. S. Dicoumarol complexes of Cu (II) based on 1,10-phenanthroline : Synthesis, X-ray diffraction studies, thermal behavior and biological evaluation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 108, p. 319–328, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.096>>.

DOMINGO-GONZALEZ, R.; PRINCE, O.; COOPER, A.; KHADER, S. Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 1–58, 2016.

DOOKIE, N.; RAMBARAN, S.; PADAYATCHI, N.; MAHOMED, S.; NAIDOO, K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. **Journal of Antimicrobial**

Chemotherapy, v. 73, n. 5, p. 1138-1151, 2018.

DOS SANTOS FERNANDES, G. F.; DE SOUZA, P. C.; MORENO-VIGURI, E.; SANTIVÁÑEZ-VELIZ, M.; PAUCAR, R.; PÉREZ-SILANES, S.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; LAZZARATO, L.; FRUTTERO, R.; MAN CHIN, C.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; SOLCIA, M. C.; RIBEIRO, C. M.; SILVA, C. S. P.; MARINO, L. B.; BOSQUESI, P. L.; HUNT, D. M.; DE CARVALHO, L. P. S.; DE SOUZA COSTA, C. A.; CHO, S. H.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; PAVAN, F. R.; DOS SANTOS, J. L. Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing Antitubercular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 8647–8660, 2017.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. **Methods in Molecular Biology**, v. 682, p. 217–234, 2007.

FRANZBLAU, S. G.; DEGROOTE, M. A.; CHO, S. H.; ANDRIES, K.; NUERMBERGER, E.; ORME, I. M.; MDLULI, K.; ANGULO-BARTUREN, I.; DICK, T.; DARTOIS, V.; LENAERTS, A. J. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 92, n. 6, p. 453–488, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2012.07.003>>.

GAO, E.; SUN, N.; ZHANG, S.; DING, Y.; QIU, X.; ZHAN, Y.; ZHU, M. Synthesis, structures, molecular docking, cytotoxicity and bioimaging studies of two novel Zn(II) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.013>>.

GAO, W.; KIM, J. Y.; ANDERSON, J. R.; AKOPIAN, T.; HONG, S.; JIN, Y. Y.; KANDROR, O.; KIM, J. W.; LEE, I. A.; LEE, S. Y.; MCALPINE, J. B.; MULUGETA, S.; SUNOQROT, S.; WANG, Y.; YANG, S. H.; YOON, T. M.; GOLDBERG, A. L.; PAULI, G. F.; SUH, J. W.; FRANZBLAU, S. G.; CHOA, S. The cyclic peptide ecumicin targeting CLpC1 is active against *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 880–889, 2015.

GARAJ-VRHOVAC, V.; GAJSKI, G.; RAVLIĆ, S. Efficacy of HUMN criteria for scoring the micronucleus assay in human lymphocytes exposed to a low concentration of p,p'-DDT. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 6, p. 473–476, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18592119>>.

GOLDE, W. T.; GOLLOBIN, P.; RODRIGUEZ, L. L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. **Technique Lab Animal**, v. 34, n. 9, p. 39–43, 2005.

GORDON, S. V.; PARISH, T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. **Microbiology**, v. 164, n. 4, p. 437-439, 2018. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000601.v1>>.

GREEN, K. D.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Resistance in tuberculosis: What do we know and where can we go? **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013.

GRUPPO, V.; JOHNSON, C. M.; MARIETTA, K. S.; SCHERMAN, H.; ZINK, E. E.; CRICK,

D. C.; ADAMS, L. B.; ORME, I. M.; LENAERTS, A. J. Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1245–1250, 2006.

GYGLI, S. M.; BORRELL, S.; TRAUNER, A.; GAGNEUX, S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 354–373, 2017.

HASSAN, H. M.; GUO, H. L.; YOUSEF, B. A.; LUYONG, Z.; ZHENZHOU, J. Hepatotoxicity mechanisms of isoniazid: A mini-review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 12, p. 1427–1432, 2015.

HERZMANN, C.; DALLENGA, T.; KALINKE, U. Pulmonale Immunität bei Tuberkulose. **Pneumologie**, v. 35, 10 p., 2017.

HONG, J.; KIM, K. Neutral Red and Ferriox as Reversible and Rapid Redox Materials for Redox Flow Batteries. **ChemSusChem**, v. 11, p. 1866–1872, 2018.

HOUBEN, R. M. G. J.; DODD, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. **PLOS Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1-13, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002152>>.

IOERGER, T. R.; O'MALLEY, T.; LIAO, R.; GUINN, K. M.; HICKEY, M. J.; MOHAIDEEN, N.; MURPHY, K. C.; BOSHOF, H. I. M.; MIZRAHI, V.; RUBIN, E. J.; SASSETTI, C. M.; BARRY, C. E.; SHERMAN, D. R.; PARISH, T.; SACCHETTINI, J. C. Identification of New Drug Targets and Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–13, 2013.

JYOTI, M. A.; ZERIN, T.; KIM, T.H.; HWANG, T. S.; JANG, W. S.; NAM, K. W.; SONG, H. Y. In vitro effect of ursolic acid on the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* and its cell wall mycolic acid. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, p. 17–24, 2015.

KIDWAI, S.; PARK, C.; MAWATWAL, S.; TIWARI, P.; JUNG, M. G.; GOSAIN, T. P.; KUMAR, P.; ALLAND, D.; KUMAR, S.; BAJAJ, A.; HWANG, Y.; SONG, C. S.; DHIMAN, R.; LEE, I. Y.; SINGH, R. Dual Mechanism of Action of 5-Nitro-1,10-Phenanthroline against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. 1–19, 2017.

KIM, H. W.; KIM, J. S. Treatment of Latent Tuberculosis Infection and Its Clinical Efficacy. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 81, p. 6–12, 2018.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, n. 1–2, p. 185–202, 1998.

LAW, G. L.; TISONCIK-GO, J.; KORTH, M. J.; KATZE, M. G. Drug repurposing: a better approach for infectious disease drug discovery? **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 5, p. 588–592, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2013.08.004>>.

LEÓN-DÍAZ, R.; MECKES, M.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; MOLINA-SALINAS, G. M.;

VARGAS-VILLARREAL, J.; TORRES, J.; LUNA-HERRERA, J.; JIMÉNEZ-ARELLANES, A. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 45–51, 2010.

LEUNG, C. C.; CHEE, C. B. E.; ZHANG, Y. Tuberculosis updates 2018: Innovations and developments to end TB. **Respirology**, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/resp.13244>>.

LÓPEZ-GARCÍA, S.; CASTAÑEDA-SANCHEZ, J. I.; JIMÉNEZ-ARELLANES, A.; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, L.; CASTRO-MUSSOT, M. E.; HERNÁNDEZ-SANCHÉZ, J.; LUNA-HERRERA, J. Macrophage activation by ursolic and oleanolic acids during mycobacterial infection. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14348–14364, 2015.

MACHADO, D.; PIRES, D.; PERDIGÃO, J.; COUTO, I.; PORTUGAL, I.; MARTINS, M.; AMARAL, L.; ANES, E.; VIVEIROS, M. Ion channel blockers as antimicrobial agents, efflux inhibitors, and enhancers of macrophage killing activity against drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–28, 2016.

MAITRA, A.; BATES, S.; SHAIK, M.; EVANGELOPOULOS, D.; ABUBAKAR, I.; MCHUGH, T. D.; LIPMAN, M.; BHAKTA, S. Repurposing drugs for treatment of tuberculosis: a role for non-steroidal anti-inflammatory drugs. **British Medical Bulletin**, v. 118, n. 1, p. 145–155, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bmb/article-lookup/doi/10.1093/bmb/ldw019>>.

MAITRE, T.; AUBRY, A.; JARLIER, V.; ROBERT, J.; VEZIRIS, N.; BERNARD, C.; SOUGAKOFF, W.; BROSSIER, F.; CAMBAU, E.; MOUGARI, F.; RASKINE, L. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 47, n. 1, p. 3–10, 2017.

MALINGA, L.; BRAND, J.; OLORUNJU, S.; STOLTZ, A.; VAN DER WALT, M. Molecular analysis of genetic mutations among cross-resistant second-line injectable drugs reveals a new resistant mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 4, p. 433–437, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.010>>.

MATARNEH, C. M. Al; MANGALAGIU, I. I.; SHOVA, S.; DANAC, R. Synthesis, structure, antimycobacterial and anticancer evaluation of new pyrrolo-phenanthroline derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 3, pg. 470–480, 2016.

MATTEELLI, A.; ROGGI, A.; CARVALHO, A. C. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 111–118, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729727>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3979688>>.

MCCANN, M.; COYLE, B.; MCKAY, S.; MCCORMACK, P.; KAVANAGH, K.; DEVEREUX, M.; MCKEE, V.; KINSELLA, P.; O'CONNOR, R.; CLYNES, M. Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)₂]ClO₄ (phendio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. **Biomaterials**, v. 17, n. 6, p. 635–645, 2004.

MCCANN, M.; GERAGHTY, M.; DEVEREUX, M.; O'SHEA, D.; MASON, J.; O'SULLIVAN, L. Insights into the mode of action of the anti-candida activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates. **Metal Based Drugs**, v. 7, n. 4, p. 185–193, 2000.

MCNERNEY, R.; TRAORÉ, H. A review: Mycobacteriophage and their application to disease control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 223–233, 2005.

MIRANDA, M. S.; BREIMAN, A.; ALLAIN, S.; DEKNUYDT, F.; ALTARE, F. The tuberculous granuloma: An unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 14 p., 2012.

MUIJSERS, R. B. R.; VAN DEN WORM, E.; FOLKERTS, G.; BEUKELMAN, C. J.; KOSTER, A. S.; POSTMA, D. S.; NIJKAMP, F. P. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 932–936, 2000.

NARENDER, M.; JASWANTH, S. B.; UMASANKAR, K.; MALATHI, J.; RAGHURAM REDDY, A.; UMADEVI, K. R.; DUSTHACKEER, A. V. N.; VENKAT RAO, K.; RAGHURAM, R. A. Synthesis, in vitro antimycobacterial evaluation and docking studies of some new 5,6,7,8-tetrahydropyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one schiff bases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 3, p. 836–840, 2016.

NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. v. 23, n. 3, p. 836-840, 2016.

OECD/OCDE - GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity, Acute Toxic Class Method. **OECD Guideline for Testing of Chemicals**, n. 423, p. 1–14, 2001.

O'FLAHERTY, S.; ROSS, R. P.; COFFEY, A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria: Review article. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 801–819, 2009.

OLIVEIRA, A. P. S.; SOUSA, J. F.; DA SILVA, M. A.; HILÁRIO, F.; RESENDE, F. A.; CAMARGO, M. S.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Estrogenic and chemopreventive activities of xanthenes and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Steroids**, v. 78, p. 1053-1063, 2013.

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

PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PARISH, T; ROBERTS, D. M. Mycobacteria Protocols, Isolation and Characterization of Compound-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Molecular Biology**, vol. 1285, p. 317-328, 2015.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I. F.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V.; GAMBINO, D.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099–5107, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.08.023>>.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; DO NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; DEFLON, V. M.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium (II)

phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 598–601, 2010.

PAVAN, F.R.; SATO, D.N.; LEITE, C.Q.F. An Approach to the Search for New Drugs Against Tuberculosis, **Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance**, v. 15, cap. 5, p. 138-146, 2012. Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/31618. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/an-approach-to-search-for-new-drugs-against-tuberculosis>>

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 6, p. 399–407, 2008.

PIURI, M.; JACOBS, W. R.; HATFULL, G. F. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 12 p., 2009.

PODDER, B.; JANG, W. S.; NAM, K. W.; LEE, B. E.; SONG, H. Y. Ursolic acid activates intracellular killing effect of macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 738–744, 2015.

PUBCHEM – Open Chemistry Database. **Ferroun Indicator Solution**, SID: 329749277. Desenvolvida por National Center for Biotechnology Information, U.S. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/329749277>> Acesso em: 28/08/2018.

PUBCHEM – Open Chemistry Database. **Substance 1,10-Phenanthroline**, SID: 24848008. Desenvolvida por National Center for Biotechnology Information, U.S. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24848008>> Acesso em: 25/08/18.

RODRIGUES, L.; RAMOS, J.; COUTO, I.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: Correlation with antibiotic resistance. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 35, 2011.

ROSEMBERG, J. Mecanismo Imunitário Da Tuberculose Síntese E Atualização. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 1, p. 35–59, 2001. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X2001000100005>.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, 2007.

SAHA, D. K.; PATITUNGKHO, S.; PADHYE, S. Metalloantitubercular compounds Part 3 : Synthesis , crystal structure , spectroscopy , electrochemistry and antimycobacterial activity of the copper (II) ciprofloxacin (cfH) complex and its phenanthroline adduct. **Transition Metal Chemistry**, v. 30, p. 334–340, 2005

SALINA, E.; RYABOVA, O.; KAPRELYANTS, A.; MAKAROV, V. New 2-Thiopyridines as potential candidates for killing both actively growing and dormant *Mycobacterium tuberculosis* cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 55–60, 2014.

SATO, D. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase**. 2003. 76 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química,

Universidade Estadual Paulista, Araraquara. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/100761>>.

SAUNDERS, B. M.; BRITTON, W. J. Life and death in the granuloma: Immunopathology of tuberculosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 103–111, 2007.

SCHWARTZ, Y. S.; DUSHKIN, M. I.; VAVILIN, V. A.; MELNIKOVA, E. V.; KHOSCHENKO, O. M.; KOZLOV, V. A.; AGAFONOV, A. P.; ALEKSEEV, A. Y.; RASSADKIN, Y.; SHESTAPALOV, A. M.; AZAEV, M. S.; SARAIEV, D. V.; FILIMONOV, P. N.; KURUNOV, Y.; SVISTELNIK, A. V.; KRASNOV, V. A.; PATHAK, A.; DERRICK, S. C.; REYNOLDS, R. C.; MORRIS, S.; BLINOV, V. M. Novel conjugate of moxifloxacin and carboxymethylated glucan with enhanced activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1982–1988, 2006.

SEIFERT, M.; CATANZARO, D.; CATANZARO, A.; RODWELL, T. C. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

SHARMA, S.; KALIA, N. P.; SUDEN, P.; CHAUHAN, P. S.; KUMAR, M.; RAM, A. B.; KHAJURIA, A.; BANI, S.; KHAN, I. A. Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 94, n. 4, p. 389–396, 2014.

SHISHOO, C. J.; SHAH, S. A.; RATHOD, I. S.; SAVAILE, S. S.; VORA, M. J. Impaired bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 53–67, 2001.

SHYLA, B.; BHASKAR, C. V.; NAGENDRAPPA, G. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Iron (III) oxidized nucleophilic coupling of catechol with o-tolidine / p-toluidine followed by 1 , 10-phenanthroline as new and sensitivity improved spectrophotometric methods for iro. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 86, p. 152–158, 2012.

SILVA, I. C.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; PAVAN, F. R. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 300–307, 2017.

SIRICILLA, S.; MITACHI, K.; WAN, B.; FRANZBLAU, S. G.; KUROSU, M. Discovery of a capuramycin analog that kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and its synergistic effects with translocase i inhibitors. **Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 4, p. 271–278, 2014.

SIRGEL, F.A.; WIID, I.J.; VAN HELDEN, P.D. Measuring minimum inhibitory concentrations in mycobacteria. **Methods in Molecular Biology**, v. 465, p.173-186, 2009.

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

SONG, L.; WU, X. Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 6, p. 421–429, 2016.

STRINGER, T.; SELDON, R.; LIU, N.; WARNER, D. F.; TAM, C.; CHENG, L. W.; LAND, K. M.; SMITH, P. J.; CHIBALE, K.; SMITH, G. S. Antimicrobial activity of organometallic

isonicotinyl and pyrazinyl ferrocenyl-derived complexes. **The Royal Society of Chemistry**, v. 20, 12 p., 2017.

SUN, Z.; XU, Y.; SUN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X.; HUANG, H.; LI, C. Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Is Associated with Efflux Pump Activity Independent of Resistance Pattern and Genotype. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 06, p. 525-535, 2014.

TANG, P.; JOHNSTON, J. Treatment of Latent Tuberculosis Infection. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 9, p. 371–379, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40506-017-0135-7>>.

TARALLO, M. B.; URQUIOLA, C.; MONGE, A.; PARAJÓN, B.; RIBEIRO, R. R.; COSTA-FILHO, A. J.; MERCADER, R. C.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; TORRE, M. H.; GAMBINO, D. Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 11, p. 1164–1170, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.07.005>>.

THOMAS, P.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. **Methods in Molecular Biology**, v. 682, p. 217–234, 2011.

TOUSIF, S.; SINGH, D. K.; MUKHERJEE, S.; AHMAD, S.; ARYA, R.; NANDA, R.; RANGANATHAN, A.; BHATTACHARYYA, M.; KAER, L. Van; KAR, S. K.; DAS, G. Nanoparticle-formulated curcumin prevents posttherapeutic disease reactivation and reinfection with *Mycobacterium tuberculosis* following isoniazid therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 739, p. 1–12, 2017.

UPADHYE, V.; MAJUMDAR, A.; GOMASHE, A.; JOSHI, D.; GANGANE, N.; THAMKE, D.; MENDIRATTA, D.; HARINATH, B. C. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* secretory serine protease blocks bacterial multiplication both in axenic culture and in human macrophages. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 41, n. 8, p. 569–576, 2009.

VARDEVANYAN, P. O.; ANTONYAN, A. P.; PARSADANYAN, M. A.; DAVTYAN, H. G.; KARAPETYAN, A. T. The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 35, n. 6, p. 527–533, 2003.

VASAVA, M. S.; BHOI, M. N.; RATHWA, S. K.; BORAD, M. A.; NAIR, S. G.; PATEL, H. D. Drug development against tuberculosis: Past, present and future. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 64, n. 4, p. 252–275, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijtb.2017.03.002>>.

WALKER, N. F.; MEINTJES, G.; WILKINSON, R. J. HIV-1 and the immune response to TB. **Future Virol.**, v. 8, p. 57-80, 2013.

WAYNE, L. G.; SOHASKEY, C. D. Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Annual Reviews Microbiology**, v. 55, p. 139-163, 2001.

WAYNE, P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth international supplement M100-S18. In: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. CLSI. Laboratory Quality Control Based on Risk Management; Approved Guideline. CLSI document EP23-ATM, 2008.

WELIN, A.; RAFFETSEDER, J.; EKLUND, D.; STENDAHL, O.; LERM, M. Importance of phagosomal functionality for growth restriction of *Mycobacterium tuberculosis* in primary human macrophages. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 5, p. 508–518, 2011.

WELLINGTON, S.; HUNG, D. T. The Expanding Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Drug Targets. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 5, pg. 696-714, 2018.

WHO - World Health Organization, Library Cataloguing-in-Publication Data. **Global Tuberculosis Report**, 2014.

WHO - World Health Organization, Library Cataloguing-in-Publication Data. **Global Tuberculosis Report**, 2016.

WHO - World Health Organization, Library Cataloguing-in-Publication Data. **Global Tuberculosis Report**, 2018.

WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. **Essential medicines and health products**, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **Global Tuberculosis Report**, 2017.

XU, J.; TASNEEN, R.; PELOQUIN, C. A.; ALMEIDA, D. V.; LI, S.; BARNES-BOYLE, K.; LU, Y.; NUERMBERGER, E. crossm Verapamil Increases the Bioavailability and Efficacy of Bedaquiline but Not Clofazimine in a Murine Model of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, p. 1–8, 2018.

YOUNGA, D.; VERRECK, F. A. W. Creativity in tuberculosis research and discovery. **Tuberculosis**, v. 92, n. SUPPL.1, p. 14–16, 2012.

ZIGNOL, M.; DEAN, A. S.; PH, D.; FALZON, D.; GEMERT, W. V.; WRIGHT, A.; DEUN, A. V.; PORTAELS, F.; PH, D.; LASZLO, A.; PH, D.; ESPINAL, M. A.; MÉNDEZ, A. P.; BLOOM, A.; AZIZ, M. A.; WEYER, K.; SC, D.; JARAMILLO, E.; NUNN, P.; FLOYD, K.; PH, D.; RAVIGLIONE, M. C. Special Report Twenty Years of Global Surveillance of Antituberculosis-Drug Resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 11, p. 1081–1089, 2016.

ZUMLA, A.; ATUN, R.; MAEURER, M.; MWABA, P.; MA, Z.; O'GRADY, J.; BATES, M.; DHEDA, K.; HOELSCHER, M.; GRANGE, J. Viewpoint: Scientific dogmas, paradoxes and mysteries of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tropical Medicine and International Health**, v. 16, n. 1, p. 79–83, 2011.

Capítulo II

Artigo publicado durante o mestrado:

FERNANDES, G. F. S.; DE SOUZA, P. C.; MORENO-VIGURI, E.; SANTIVÁÑEZ-VELIZ, M.; PAUCAR, R.; PÉREZ-SILANES, S.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; LAZZARATO, L.; FRUTTERO, R.; CHIN, C. M.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; SOLCIA, M. C.; RIBEIRO, C. M.; SILVA, C. S. P.; MARINO, L. B.; BOSQUESI, P. L.; HUNT, D. M.; DE CARVALHO, L. P. S.; COSTA, C. A. S.; CHO, S. H.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; PAVAN, F. R.; DOS SANTOS, J. L. Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing Antitubercular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 8647-8660, 2017.