



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Karyn Fernanda Manieri

**Análise da atividade *in vitro* e *in vivo* de derivados nitroimidazóis frente ao
*Mycobacterium tuberculosis***

Araraquara –SP

2022

KARYN FERNANDA MANIERI

**Análise da atividade *in vitro* e *in vivo* de derivados nitroimidazóis frente ao
*Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentado ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Araraquara –SP

2022

M278a Manieri, Karyn Fernanda.
Análise da atividade *in vitro* e *in vivo* de derivados nitroimidazóis
frente ao *Mycobacterium tuberculosis* / Karyn Fernanda Manieri. –
Araraquara: [S.n.], 2022.
57 f. : il.

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

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

1. *M. tuberculosis*. 2. Antimicrobianos. 3. Compostos híbridos. 4. Novos
fármacos. 5. Nitroimidazóis. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise da atividade in vitro e in vivo de derivados nitroimidazóis frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

AUTORA: KARYN FERNANDA MANIERI

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

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

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

Prof. Dr. NILTON ERBET LINCOPAN HUENUMAN (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia / Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Profa. Dra. ROSILENE FRESSATTI CARDOSO (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Universidade Estadual de Maringá

Araraquara, 19 de agosto de 2022

CAPÍTULO I

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa cujo principal agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 foi responsável por 1,3 milhão de mortes. A TB possui um tratamento longo, de no mínimo 6 meses, constituído do uso de 4 antibióticos concomitantes: rifampicina (RFP), isoniazida (INH), etambutol (ETH), e pirazinamida (PZA), cada um possuindo um mecanismo de ação diferente para prevenção do surgimento de cepas resistentes aos antibióticos. Entretanto, o prolongado tempo de tratamento, os efeitos colaterais adversos, e a melhora dos sintomas dos pacientes que acreditam já estarem curados fazem com que os mesmos abandonem a terapia, aumentando a pressão seletiva frente aos bacilos, e resultando em cepas resistentes, podendo ser rifampicina (RR), multidrogas (MDR-TB), pré-extensivamente resistentes (Pré-XDR) ou extensivamente resistentes (XDR-TB). Neste trabalho foram apresentados 10 compostos híbridos (19-01; 19-02; 19-03; 19-04; 19-05; 19-07; 19-08; 19-09; 19-10 e 19-13) desenvolvidos a partir do composto benzofuroxânico 8, o BZ8, anteriormente estudado por nosso grupo de pesquisa, e a pretomanida, fármaco da classe dos nitroimidazóis, utilizada em terapias de XDR-TB aprovada recentemente pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) demonstraram excelente atividade dos compostos contra cepa sensível H₃₇Rv, com o menor valor sendo de 0,18 µM, e contra isolados clínicos resistentes, com valores de 0,18 µM em MDR-TB e 0,17 µM em RR. O Índice de Citotoxicidade (IC₅₀) apresentou segurança em células de hepato-carcinoma humano (HEP-G2), macrófagos murinos (J774A.1) e fibroblastos pulmonares (MRC-5), com valores acima de 100 µM. O Índice de Seletividade (IS) foi acima de 78 µM, com a maioria apresentando valores em torno de 400 µM. A análise da atividade intramacrofágica dos compostos demonstrou que os mesmos possuem atividade semelhante à RFP e melhores que pretomanida a 5x sua CIM₉₀. Ensaio de espectro de ação determinaram que os 10 compostos apresentaram atividade específica em Mtb. Os compostos 19-01 e 19-02 não foram tóxicos no Ensaio de Toxicidade Aguda em modelo alternativo de *Galleria mellonella* nas concentrações de 2.000 mg/kg e 1.000 mg/kg de peso corpóreo respectivamente. Dessa forma, nossos ensaios foram capazes de demonstrar uma excelente atividade contra Mtb sensível e resistente à medicamentos, com baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*, sendo escolhidos 6 compostos líderes para as próximas etapas, sendo eles os 19-01, 19-02, 19-03 e 19-05, 19-07 e 19-08.

Palavras-chave: *M. tuberculosis*, antimicrobianos, compostos híbridos, novos fármacos, nitroimidazóis.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease whose main etiologic agent is *Mycobacterium tuberculosis*. According to the World Health Organization (WHO), in 2020 it was responsible for 1.3 million deaths. TB has a long treatment, of at least 6 months, consisting of the use of 4 concomitant antibiotics: rifampicin (RFP), isoniazid (INH), ethambutol (ETH), and pyrazinamide (PZA), each one having a different mechanism of action for TB. prevention of the emergence of antibiotic-resistant strains. However, the prolonged treatment time, the adverse side effects, and the improvement of the symptoms of the patients who believe they are already cured make them abandon the therapy, increasing the selective pressure against the bacilli, and resulting in resistant strains, which can be rifampicin (RR), multidrug (MDR-TB), pre-extensively resistant (Pre-XDR) or extensively resistant (XDR-TB). In this work, 10 hybrid compounds (19-01; 19-02; 19-03; 19-04; 19-05; 19-07; 19-08; 19-08; 19-09; 19-10 and 19-13) were presented. from the benzofuroxane compound 8, BZ8, previously studied by our research group, and pretomanid, a drug of the nitroimidazole class, used in XDR-TB therapies recently approved by the Food and Drug Administration (FDA). Minimum Inhibitory Concentration (MIC90) assays showed excellent activity of the compounds against the susceptible strain H37Rv, with the lowest value being 0.18 μM and against resistant clinical isolates, with values of 0.18 μM in MDR-TB and 0.17 μM in RR. The Cytotoxicity Index (IC50) showed safety in human hepato-carcinoma cells (HEP-G2), murine macrophages (J774A.1), and lung fibroblasts (MRC-5), with values above 100 μM . The Selectivity Index (IS) was above 78 μM , with most presenting values around 400 μM . The analysis of the intramacrophagic activity of the compounds showed that they have similar activity to RFP and are better than pretomanid at 5x its MIC90. Spectrum of action assays determined that the 10 compounds showed specific activity on Mtb. Compounds 19-01 and 19-02 were not toxic in the Acute Toxicity Assay in an alternative model of *Galleria mellonella* at concentrations of 2,000 mg/kg and 1,000 mg/kg of body weight, respectively. Thus, our assays were able to demonstrate excellent activity against drug-resistant and sensitive Mtb, with low toxicity in vitro and in vivo, and 6 leading compounds were chosen for the next steps, namely 19-01, 19-02, 19-03 e 19-05, 19-07 e 19-08.

Keywords: *M. tuberculosis*, antimicrobials, hybrid compounds, new drugs, nitroimidazoles.

Só há duas maneiras de se viver a vida: a primeira é vive-la como se os milagres não existissem. A segunda é vive-la como se tudo fosse milagre.

- Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Para que este trabalho fosse realizado da forma mais correta e fiel possível, tive auxílio de algumas pessoas as quais devo meus profundos agradecimentos e estima:

Às pesquisadoras do Laboratório de Pesquisa em Tuberculose - Departamento de Ciências Biológicas da UNESP, minhas companheiras de bancada - e muito mais, Débora, Camila e Fernanda. Vocês tornaram meus dias cheios em dias de muito aprendizado, amizades e resultados maravilhosos;

À minha mãe, Eliane, que sempre me apoiou em meus estudos acadêmicos, mesmo sabendo de todas as dificuldades em se trilhar esse caminho. Seu amor ao ensino foi muito importante nesta etapa.

Ao meu companheiro de vida, Douglas, que esteve comigo em todos os momentos bons e difíceis desse projeto, seu apoio foi fundamental para que a vida ficasse mais leve.

À minha psicóloga e amiga, Dulce Helena. Obrigada por me mostrar que a vida é maior e mais real do que as minhas ansiedades e anseios. Graças a você me sinto cada vez mais confiante ao seguir meus sonhos.

Ao meu orientador, Dr. Fernando Rogério Pavan, pela confiança em me entregar esse projeto e pela oportunidade de obter tantos conhecimentos, os quais com toda certeza me tornaram uma profissional muito melhor.

Aos demais colegas de laboratório nos quais contribuíram de certa forma com a realização deste trabalho, como Mel, Rone, Bel, com conselhos, metodologias, conversas acolhedoras e bons momentos que tornaram esse caminho mais gostoso de trilhar.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo nº 2020/08370-5 pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Países que tiveram pelo menos 100.000 casos de tuberculose notificados no ano de 2020.	13
Figura 2 - Esquema simplificado da parede celular micobacteriana.....	14
Figura 3 - Esquematização das formas de Tuberculose latente (a) e ativa (b).	16
Figura 4 - Estrutura química dos quatro fármacos de primeira linha utilizados na terapia contra tuberculose sensível	17
Figura 5 - Estrutura química do composto Benzofuroxanico 8 (BZ8).....	19
Figura 6 - Estrutura química do fármaco Pretomanida, inicialmente conhecido como PA-824.....	20
Figura 7 - Esquema de síntese dos compostos derivados.....	23
Figura 8 – Estágios larvais da <i>G. mellonella</i> . O ensaio é realizado entre os estágios 5 e 6.	27
Figura 9 - Microplaca de 96 poços esquematizada após a aplicação e redução da resazurina em contato com <i>M. tuberculosis</i>	28
Figura 10 - Eficácia dos compostos na inibição do crescimento de <i>M. tuberculosis</i> em ambiente intramacrofágico	37
Figura 11 – Porcentagem de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> em 5 dias de tratamento na concentração de 2.000 mg/kg para 19-01 e 1.000 mg/kg para 19-02	39
Figura 12 - Grupo de larvas do composto 19-01 após 24h do recebimento da dose	39
Figura 13 - Grupo de larvas do composto 19-02 após 24h do recebimento da dose	40
Figura 14 - Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 24h do recebimento da dose.....	40
Figura 15 - Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 24h do recebimento da dose.....	41
Figura 16 - Grupo do composto 19-01 após 48h do recebimento da dose	41
Figura 17 - Grupo do composto 19-02 após 48h do recebimento da dose	41
Figura 18 - Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 48h do recebimento da dose.....	42
Figura 19 - Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 48h do recebimento da dose.....	42
Figura 20 - Grupo do composto 19-01 após 72h do recebimento da dose	42
Figura 21 - Grupo do composto 19-02 após 72h do recebimento da dose	43
Figura 22 - Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 72h do recebimento da dose.....	43
Figura 23 - Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 72h do recebimento da dose.....	43
Figura 24 - Grupo do composto 19-01 após 96h do recebimento da dose	44
Figura 25 - Grupo do composto 19-02 após 96h do recebimento da dose	44
Figura 26 - Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 96h do recebimento da dose.....	44

Figura 27- Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 96h do recebimento da dose.....	45
Figura 28- Grupo do composto 19-01 após 120h do recebimento da dose	45
Figura 29- Grupo do composto 19-02 após 120h do recebimento da dose	45
Figura 30- Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 120h do recebimento da dose.....	46
Figura 31- Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 120h do recebimento da dose.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química dos compostos híbridos de BZ8 e Pretomanida	21
Tabela 2 - Resultados de Concentração Inibitória Mínima ₉₀ sobre atividade dos compostos contra <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.....	29
Tabela 3 - Resultados de Concentração Inibitória Mínima ₉₀ de compostos derivados nitroimidazóis em isolados clínicos resistentes de <i>M. tuberculosis</i>	32
Tabela 4 - Resultados de Índice de Citotoxicidade ₅₀ sobre atividade dos compostos frente a três linhagens celulares.....	33
Tabela 5 - Valores do Índice de Seletividade baseados no cálculo de IC ₅₀ / CIM ₉₀ das três linhagens celulares e do <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.....	35
Tabela 6 - Resultados de Concentração Inibitória Mínima ₉₀ dos derivados nitroimidazóis contra a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em <i>Candida albicans</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BZ8	Benzofuroxano 8
Caco-2	Adenocarcinoma colorretal humano
CO ₂	Dióxido carbônico
CIM ₉₀	Concentração Inibitória Mínima de 90%
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETH	Etambutol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEP-G2	Carcinoma hepatocelular humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC ₅₀	Índice de Citotoxicidade de 50%
IS	Índice de Seletividade
INH	Isoniazida
J774A.1	Macrófagos murinos
MDR- TB	Tuberculose Multidroga resistente
MRC-5	Fibroblastos humanos normais
OADC	Suplemento constituído de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
OMS	Organização Mundial da
Pré-XDR TB	Tuberculose pré-extensivamente resistente
PZA	Pirazinamida
REMA	<i>Resazurin Microtiter Assay</i>
RFP	Rifampicina
RPM	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RR- TB	Tuberculose Resistente a Rifampicina
TB	Tuberculose
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UNESP	Universidade Estadual Paulista
XDR-TB	Tuberculose Extensivamente Resistente

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
AGRADECIMENTOS	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Tuberculose.....	12
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
1.3 Tratamento.....	16
1.4 Resistência a medicamentos (Tolerância, resistência e persistência).....	18
1.5 Desenvolvimento de novos fármacos contra TB.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Síntese dos derivados nitroimidazóis	23
3.2 Cepas de <i>M. tuberculosis</i>	23
3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) frente o <i>M. tuberculosis</i> em estado metabólico ativo.....	24
3.4 Ensaios de citotoxicidade com linhagens de células macrófágicas (J774A.1), fibroblastos pulmonares (MRC-5) e células de hepato carcinoma (Hep-G2).....	24
3.5 Determinação do Índice de Citotoxicidade (IC ₅₀).....	24
3.6 Determinação do Espectro de Atividade	25
3.7 Ensaio de sobrevivência bacteriana em ambiente intramacrofágico	26
3.8 Avaliação da toxicidade aguda em <i>Galleria mellonella</i>	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) dos compostos derivados nitroimidazóis em <i>M. tuberculosis</i> em estado metabólico ativo	28

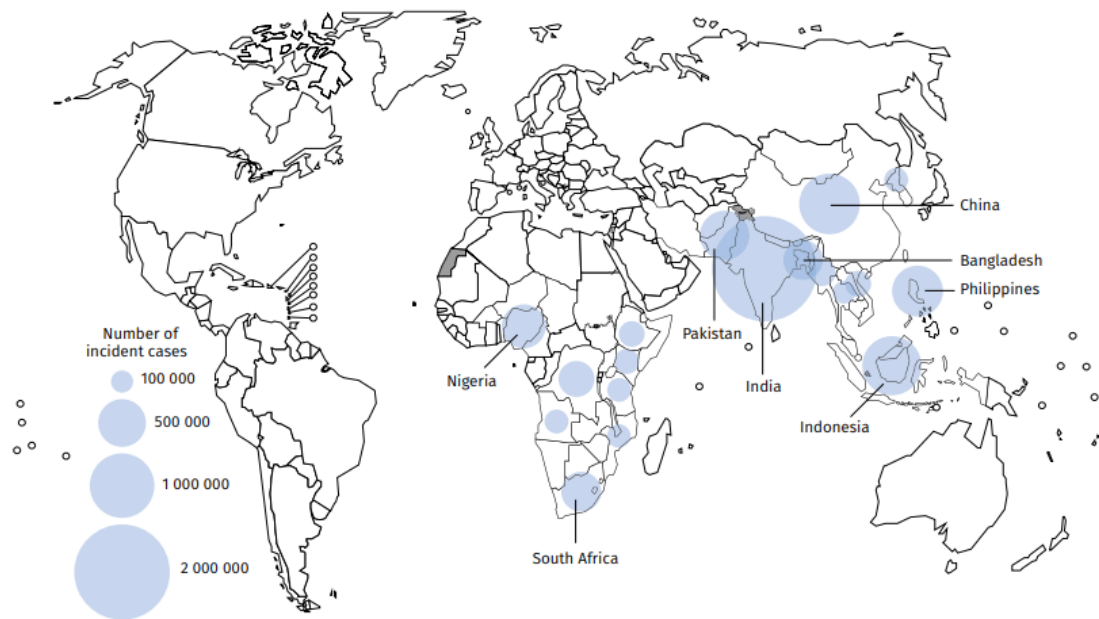
4.2	Determinação do Índice de Citotoxicidade (IC ₅₀)	32
4.3	Determinação o Índice de Seletividade (IS) das moléculas afim de estabelecer as mais promissoras para testes posteriores	34
4.4	Determinação do Espectro de Atividade	35
4.5	Ensaio de sobrevivência intramacrofágica.....	36
4.6	Avaliação da Toxicidade Aguda em <i>Galleria mellonella</i>	38
5	CONCLUSÕES	48
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

A Tuberculose (TB) é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, e segundo dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 foi responsável por 1,3 milhão de mortes, sem contar as mortes não notificadas devido a pandemia da COVID-19. A TB é considerada um problema de saúde pública e em dias atuais, é considerada a segunda doença infecciosa causada por um único agente etiológico que mais mata no mundo, atrás apenas da COVID-19 (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2021). É uma doença crônica de progressão lenta, que afeta os seres humanos e prioritariamente prejudica os pulmões, podendo, entretanto, afetar outras partes do organismo, como o sistema nervoso central, o sistema linfático e circulatório (BANSAL et al., 2016). Geralmente, os indivíduos infectados não apresentam sintomas, mas quando ocorre, aparecem sintomas como tosse persistente por mais de duas semanas, febre, perda de apetite e consequentemente grande perda de peso, fadiga e dores no peito (PAI et al., 2016). A TB é vista atualmente como a doença da pobreza. A maioria dos casos de TB são notificados em países pobres e emergentes (fig. 1), levando a uma relação direta à desnutrição, comorbidades como HIV e diabetes, falta de acesso à saúde pública de qualidade e marginalização perante a sociedade.

Figura 1 - Países que tiveram pelo menos 100.000 casos de tuberculose notificados no ano de 2020



Fonte: *Global tuberculosis report*, 2021, pag. 11.

Estudos de estimativa sobre a mortalidade por TB foram realizados no ano de 2020 e constatarem um problema amedrontador: os casos de morte por TB para o ano de 2021 tendem a dobrar, enquanto que os casos incidentes para a doença tendem a aumentar drasticamente do ano de 2022 em diante. Isso pode vir a ocorrer devido à queda significativa de notificações e diagnósticos de TB diante do cenário pandêmico atual, consequente da COVID-19. Nos últimos dois anos, 2020 e 2021, o número de diagnósticos e tratamentos realizados contra TB diminuiu preocupantemente, chegando a ser comparado com os número de 2012, um retrocesso de 8 anos no combate à doença (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2021).

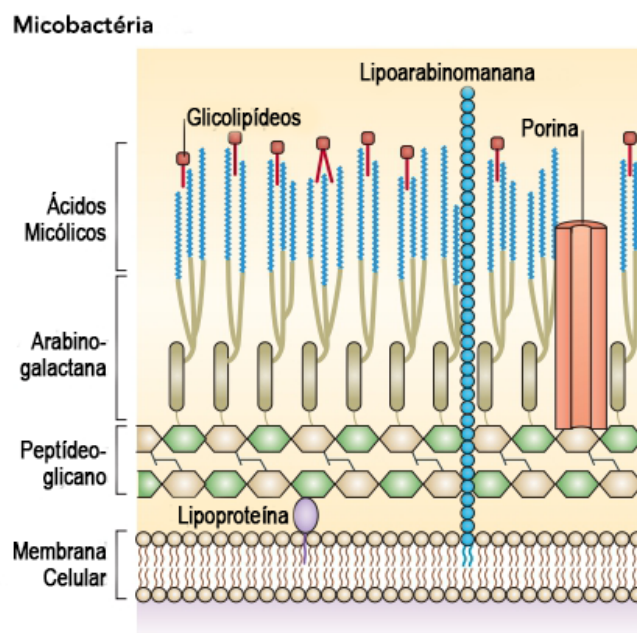
O controle da TB é complicado devido a forma como a doença progride no organismo do hospedeiro. Cerca de 1/4 da população mundial apresenta a TB em seu estado latente, ou seja, o indivíduo está infectado pelo bacilo, entretanto não manifesta sintomas da doença. Essa condição os torna hospedeiros reservatórios de *M. tuberculosis* por muitos anos, chegando a décadas, até que por algum mecanismo imunitário que, em partes, ainda é desconhecido, a doença se manifesta em cerca de 5-10% dessa população infectada e o indivíduo passa a transmitir o patógeno à outras pessoas (FURIN et al., 2019; CAMPANIÇO et al., 2020). É entendido, atualmente, que não somente a patogenia da tuberculose ativa ou latente influencia na forma como a doença se manifestará no organismo. A interação microrganismo-hospedeiro demonstra que até mesmo a maneira como a resposta imune adquirida que está presente envolta

do granuloma caseoso se comporta, possui um modo de agir distinto da imunidade sistêmica (PAI et al., 2016).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

O bacilo *M. tuberculosis* é aeróbico, álcool-ácido resistente, e foi descrito em 1882 por Robert Koch (SAKULA, 1982). Morfologicamente, possui uma membrana celular externa rica em ácidos micólicos (fig. 2), o que torna este bacilo diferente de outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e o diferencia também, quanto a sua virulência (DULBERGER et al., 2020).

Figura 2 - Esquema simplificado da parede celular micobacteriana



Fonte: (BROWN et al., 2015)

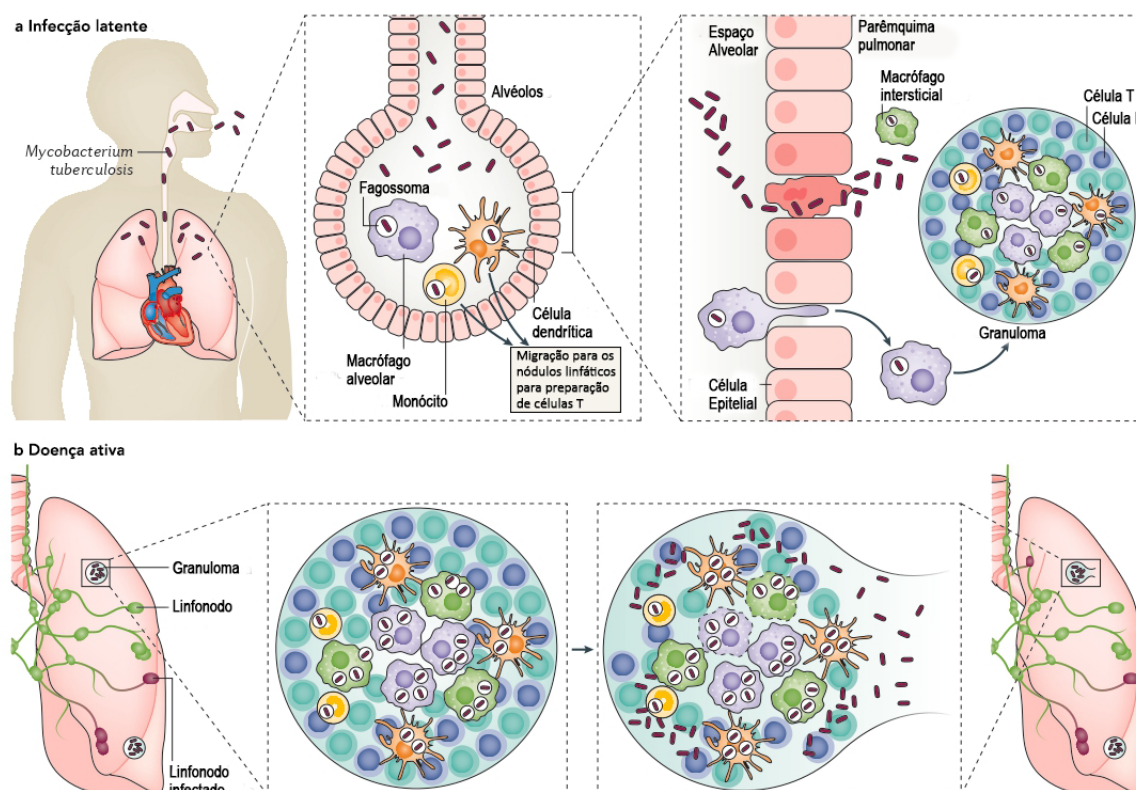
A transmissão da TB ocorre pela inalação de aerossóis contendo bacilos de *M. tuberculosis* expelidos por um indivíduo doente ao tossir, espirrar ou falar. Estudos relatam que é necessário apenas uma gota de aerossol contaminada com 1 a 3 bacilos de *M. tuberculosis* para que a infecção se estabeleça (SALGAME et al., 2015). Uma vez inalados, os bacilos vão para o trato respiratório inferior, e se acomodam mais comumente nos alvéolos pulmonares, onde há oxigenação abundante, já que são bactérias aeróbicas estritas (fig. 3). Entretanto, nos pulmões, a bactéria se depara com células da imunidade inata que vão tentar impedir que a infecção se concretize – os macrófagos alveolares. Estas células em geral, possuem como comportamento base a fagocitose de corpos estranhos, como as bactérias (RUSSELL, 2011).

Assim que os bacilos são fagocitados pelos macrófagos, ocorre um processo de fusão do fagossoma- vesícula proveniente de parte da membrana plasmática que envolveu a bactéria ao internalizá-la - com os lisossomas, organelas citoplasmáticas responsáveis por liberar enzimas que atuam na digestão celular, acarretando o surgimento do fagolisossoma, que, através de muitos processos bioquímicos internos, causa a degradação e morte bacteriana. Cerca de 90% dos casos, é este o processo evolutivo da doença, que é eliminada muitas vezes sem o conhecimento do hospedeiro (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2021). Entretanto, além das várias resistências intrínsecas do *M. tuberculosis* envolvendo sua parede e membrana celular, este microrganismo também é capaz de impedir a fusão do fagossoma com os lisossomas, alterando a maquinaria celular interna dos macrófagos alveolares, sendo capaz de sobreviver neste ambiente e até mesmo se multiplicar (PAI et al., 2016).

Os macrófagos alveolares infectados, por sua vez, liberam citocinas responsáveis por recrutar outras células de defesa do sistema imune, como mais macrófagos, linfócitos T e B, neutrófilos, monócitos e até mesmo fibroblastos, onde juntos, tentam inativar ou isolar a célula infectada, cercando-a numa espécie de agregado celular, o qual é denominado de granuloma. Através da liberação de citocinas e substâncias citotóxicas pelas células de defesa a fim de combater a infecção, o local do granuloma pode necrosar e calcificar, sendo visto macroscopicamente em algumas radiografias pulmonares e sendo denominado de granuloma caseoso (PAIVA, 2006; BANSAL et al., 2016).

Esse granuloma impede que a bactéria obtenha oxigênio e nutrientes, forçando-a a diminuir drasticamente seu metabolismo energético. Entretanto, o bacilo *M. tuberculosis* possui uma capacidade adaptativa de sobreviver em ambientes hostis pobres em oxigênio e nutrientes, o que determina seu estado de “dormência”, não replicante (RUSSELL, 2011). Nesta situação o paciente está em estado de TB latente, contudo, por motivos ainda muito discutidos, o granuloma pode sofrer uma necrose caseosa, se romper, e liberar bacilos para um ambiente favorável a replicação. Com isso, a bactéria torna a se multiplicar e pode seguir para outros sítios anatômicos, onde o hospedeiro então passa a transmitir o patógeno, apresentando os sintomas e positivando para os testes tuberculínicos, caracterizando esta fase como tuberculose ativa. Estima-se que 1/4 da população mundial esteja infectada por *M. tuberculosis* e possuam a tuberculose latente (BANSAL et al., 2016).

Figura 3 - Esquematisação das formas de Tuberculose latente (a) e ativa (b).

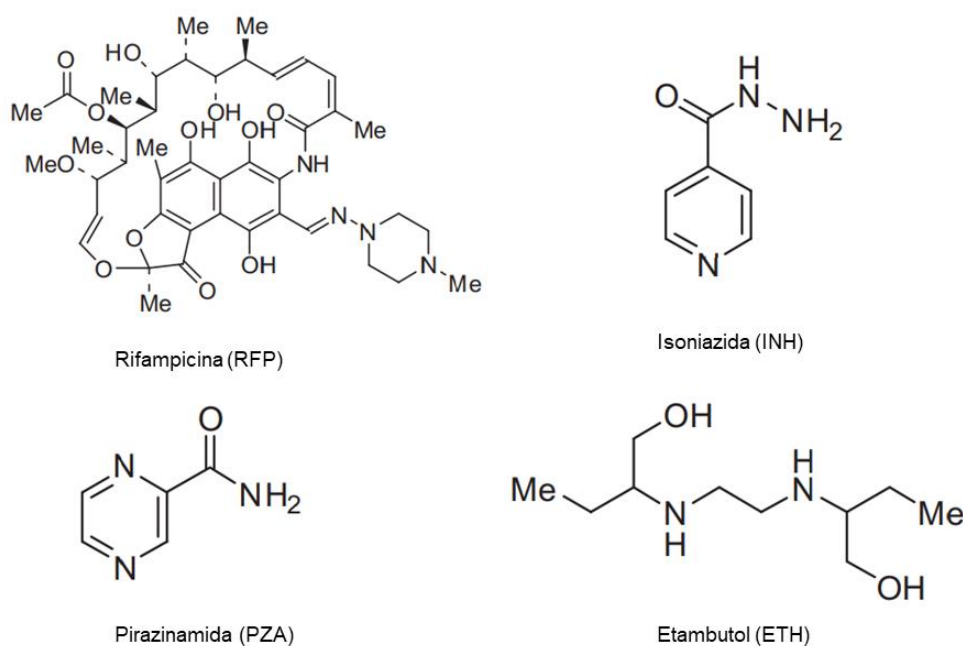


Fonte: Adaptado de PAI et al, 2016.

1.3 Tratamento

O tratamento da TB suscetível a medicamentos dura cerca de 6 meses, sendo os primeiros dois meses de tratamento chamados de Fase Intensiva, com a administração diária de 4 antibióticos diferentes (fig. 4), chamados de fármacos de primeira linha: rifampicina (RFP) que inibe a transcrição bacteriana, isoniazida (INH) que inibe a síntese de ácidos micólicos, entre outros mecanismos ainda não esclarecidos, pirazinamida (PZA), que ainda não possui um alvo bem definido e etambutol (ETH), que inibe a síntese de arabinogalactana, um constituinte da parede celular (DULBERGER et al., 2020). Os quatro meses subsequentes são de administração de RFP e INH (TIBERI et al., 2018). Nesta fase intensiva, cerca de 85% dos indivíduos acabam curados (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2021). Entretanto, estes medicamentos causam diversos efeitos colaterais para o paciente, como exemplo, a hepatotoxicidade, o que não corrobora para a conclusão da fase intensiva no tempo correto, levando a um número preocupante de desistências perante a terapia (SUÁREZ et al., 2019).

Figura 4 - Estrutura química dos quatro fármacos de primeira linha utilizados na terapia contra tuberculose sensível



Fonte: Adaptado de Global Alliance for TB drug Development (2008).

Quando o paciente com TB não responde ao tratamento inicial de 6 meses esses fármacos de primeira linha, a terapia é modificada para o tratamento de TB resistente. No esquema para tratamento de TB resistente, que pode somar, em média, 20 meses, o uso de fármacos denominados de segunda linha é empregado: o Grupo A, composto por fluoroquinolonas é caracterizado por fármacos administrados por via oral, como a moxifloxacina, levofloxacina, sendo recentemente incluídos a bedaquilina, pretomanida e a linezolida; o grupo B é composto por fármacos injetáveis, como a amicacina, capreomicina e estreptomicina, embora atualmente quase não sejam mais utilizados devido a resistência bacteriana frequentemente relatada e os efeitos colaterais adversos que diminuem drasticamente a adesão ao tratamento (TIBERI et al., 2018; WHO, 2020).

A TB resistente possui algumas definições que foram recentemente modificadas baseadas no perfil de resistência de *M. tuberculosis* (WHO, 2020). Isolados de *M. tuberculosis* que são resistentes ao fármaco de maior atividade contra TB, presente no grupo conhecido como de primeira linha, a RFP, são denominados de RR-TB – Tuberculose Resistente a Rifampicina; isolados resistentes a RFP e a INH são chamados de MDR-TB – Multidroga resistente; isolados MDR/RR-TB que também são resistentes a alguma das fluoroquinolonas agora são denominados de Pré-XDR-TB – Tuberculose Pré-extensivamente resistente; e por fim, isolados de *M. tuberculosis* que são resistentes a todos estes fármacos anteriores e ainda a pelo menos

um dos novos fármacos recentemente adicionados ao grupo A, são denominados XDR-TB – extensivamente resistentes (WHO, 2020).

A recomendação é que a terapia para TB resistente seja feita utilizando pelo menos uma fluoroquinolona do grupo A e algum outro fármaco de outros regimes terapêuticos que sejam administrados via oral para XDR-TB, sendo desencorajado desde 2020 o uso de injetáveis. O tratamento para TB resistente é muito individual para cada paciente, pois pode variar dependendo da resistência bacteriana, da resposta aos efeitos colaterais no hospedeiro e se o mesmo fez ou não tratamento anterior para TB sensível (NAHID et al., 2016; WHO, 2020).

1.4 Resistência a medicamentos (Tolerância, resistência e persistência)

Os termos e conceitos de resistência e suas formas vêm sendo discutidos com frequência nos últimos anos. Segundo Goossens et al. (2020), diferenças importantes entre cepas tolerantes/persistentes e resistentes podem explicar até mesmo resistências intrínsecas relacionadas à micobactéria, e detalhar de forma mais explícita como estas definições são, na prática.

É classificado como fenômeno de Tolerância, uma parte de uma população bacteriana heterogênea, onde, sob situação de estresse, consegue suportar, ou seja, tolerar, condições adversas a perpetuação de sua espécie por mais tempo que as demais bactérias que constituem a população como um todo. A tolerância ocorre por um tempo e cessa em seguida. Em estudos *in vitro*, por exemplo, quando cessado o crescimento de uma população bacteriana através da introdução de antibióticos no meio de cultivo, a tolerância pode se mostrar como sendo parte da população que por um tempo continuará viável mesmo em contato com o fármaco (GOOSSENS et al., 2020).

A Resistência, por outro lado, é uma característica herdada, passada de uma célula mãe para uma célula filha, onde independentemente do tempo de exposição ao antibiótico, esta cepa, em uma concentração determinada para o experimento – ainda avaliando a situação como sendo um caso *in vitro*, como um exemplo – apresentará crescimento bacteriano. A causa da resistência pode ser variada, como por super expressão de bombas de efluxo, que vão expulsar o fármaco do interior da célula, impedindo que a concentração terapêutica do antibiótico seja adequada no interior da bactéria para inibir ou a levar à morte; a alteração de vias do metabolismo, onde a bactéria é capaz de utilizar vias metabólicas alternativas enquanto está sob ataque de sua via metabólica principal por ação de antibióticos, entre outros. É necessário ressaltar que a resistência antimicrobiana tem relação com os valores de CIM₉₀ determinados

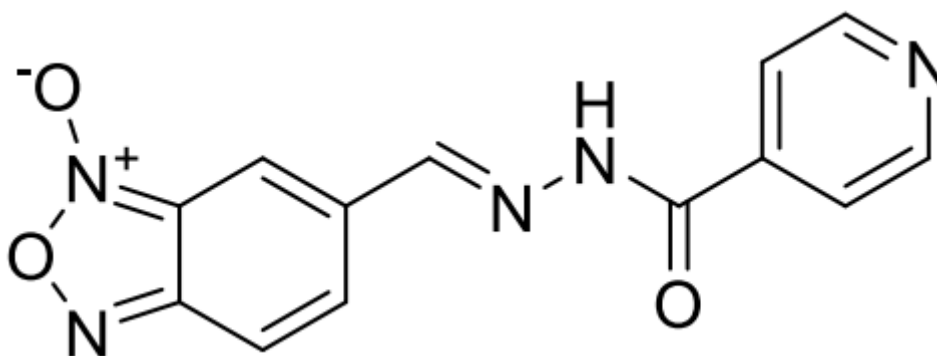
para aquela cepa. Estudos demonstram que, se a concentração do antibiótico for maior que a concentração de CIM₉₀, o fenômeno de resistência pode deixar de existir, entretanto, existem ressalvas perante a certeza de que somente a concentração aumentada seja determinante para que a resistência deixe de ocorrer (BALABAN et al., 2019).

Por fim, o termo Persistência tem relação direta com o fenômeno de Tolerância. Basicamente, são definidas como persistentes as cepas que apresentam crescimento lento e uma tolerância aos medicamentos, ou seja, toda colônia que apresentar o fenômeno de tolerância será denominada de persistente. Esta característica pode prolongar o tratamento e propiciar mais facilmente o surgimento de cepas resistentes. (GOOSSENS et al., 2020).

1.5 Desenvolvimento de novos fármacos contra TB

Compreendendo a problemática atual e buscando por resultados que mudem este cenário, nosso grupo tem trabalhado com compostos benzofuroxânicos e dentre eles, o BZ8 (figura 5), o qual demonstrou, em um estudo anterior, ser capaz de inibir totalmente a infecção pulmonar por *M. tuberculosis* em camundongos. Apesar disso, BZ8 não foi tão ativo *in vitro* em cepas resistentes e sua química possui a estrutura N-óxido que pode ser instável (DOS SANTOS FERNANDES et al., 2016). O composto BZ8 possui mecanismo de ação ainda não elucidado, tendo dado indícios de ser por meio de inibição da síntese de proteínas e, que possui um comportamento semelhante as tetraciclínas, interrompendo o início da tradução (síntese proteica), pelo aumento da produção e expressão do óxido nítrico, mediador que também é produzido pelas células macrofágicas durante a infecção pelo bacilo da TB, o que aumenta as chances de redução e morte da bactéria (DOS SANTOS FERNANDES; DE SOUZA et al., 2017).

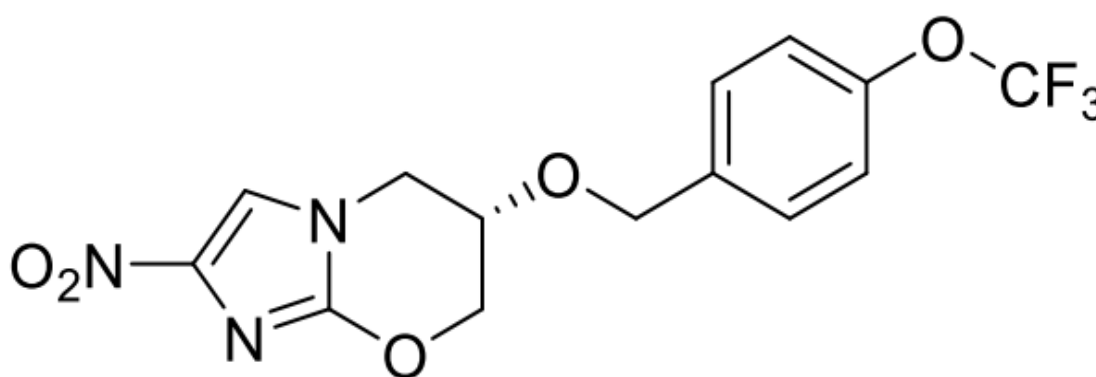
Figura 5 - Estrutura química do composto Benzofuroxânico 8 (BZ8)



Fonte: (DOS SANTOS FERNANDES et al., 2017)

A Pretomanida, fármaco desenvolvido pela TB Alliance, uma organização sem fins lucrativos, é um composto da classe dos nitroimidazóis (assim como os metronidazóis) que possui um novo mecanismo de ação, sendo considerado pertencente a uma nova classe de antimicrobianos (figura 6). Foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como medicamento para o tratamento de TB MDR e XDR no regime de tratamento incluindo bedaquilina e linezolida, o BPaL, com duração de apenas 6 meses (PARTNERSHIP, 2019).

Figura 6 - Estrutura química do fármaco Pretomanida, inicialmente conhecido como PA-824



Fonte: TB Alliance, 2019

Artigos publicados sobre o fármaco demonstram que a pretomanida foi capaz de inibir a biossíntese de proteínas e lipídeos em bactérias replicantes e que poderia ser capaz, portanto, de prejudicar a síntese de ácidos micólicos da camada bilipídica da parede celular. O mecanismo de ação da pretomanida em bactérias não replicantes parece ser pela liberação de Espécies Reativas do Nitrogênio (TB ALLIANCE, 2019). Entretanto, sua atividade bactericida reconhecida e comprovada já tem tornado este fármaco um promissor candidato comparável até mesmo com os medicamentos de primeira linha contra TB (STANCIL; et al., 2021).

Neste sentido, a proposta do presente estudo foi desenvolver compostos híbridos entre BZ8 e Pretomanida, promovendo a modificação molecular da porção benzofuroxânica por um anel nitroimidazooxazina presente na pretomanida, que atinjam as expectativas de um fármaco com menor tempo de tratamento, com baixos índices de efeitos colaterais e atividade eficiente contra o *M. tuberculosis*.

Tabela 1 - Estrutura química dos compostos híbridos de BZ8 e Pretomanida

Sigla	Composto	Nome	Peso Molecular (g/mol)
19-01		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (4-(azepan-1-yl)-3-fluorophenyl)carbamate	419,4
19-02		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (3-fluoro-4-thiomorpholinophenyl)carbamate	423,4
19-03		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (3-fluoro-4-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)phenyl)carbamate	483,4
19-04		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (3-fluoro-4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)phenyl)carbamate	484,4
19-05		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (4-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-3-fluorophenyl)carbamate	516,9
19-07		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (3-fluoro-4-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)phenyl)carbamate	550,4
19-08		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (3-fluoro-4-(4-(5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)phenyl)carbamate	551,4
19-09		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (3-fluoro-4-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamate	405,3
19-10		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (3-fluoro-4-(4-(methylsulfonyl)piperazin-1-yl)phenyl)carbamate	484,4
19-13		(S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl (3-fluoro-4-morpholinophenyl)carbamate	407,3

Fonte: Guilherme Fernandes – Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, 2020

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* de derivados nitroimidazóis em *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 Objetivos específicos

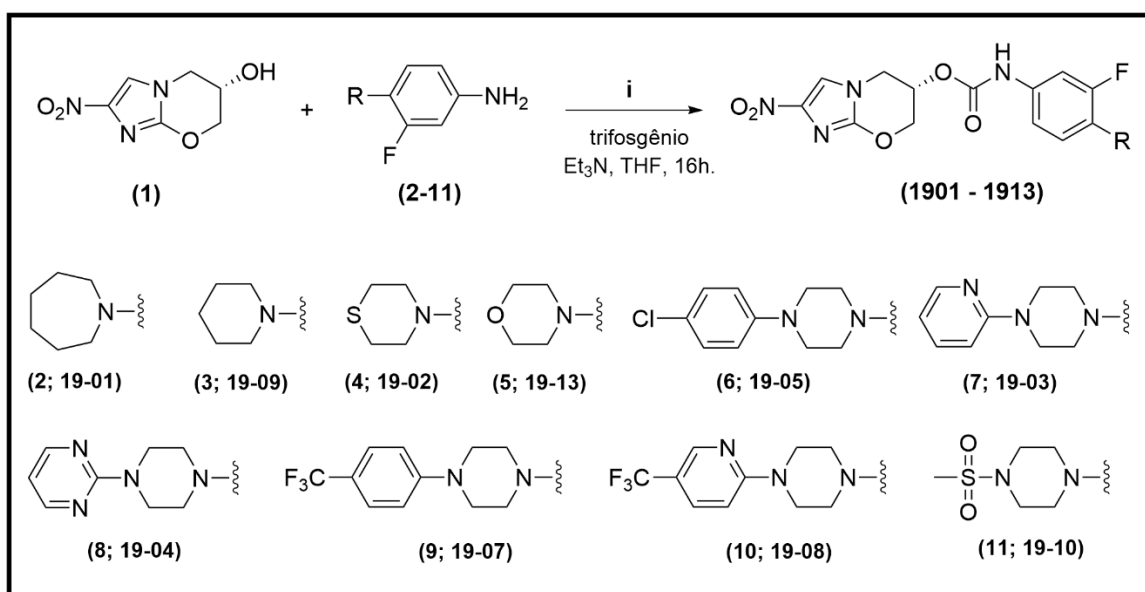
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) dos compostos derivados nitroimidazóis pelo método de REMA (*Resazurin Microtiter Assay*) em cepa padrão sensível de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294);
- Determinar a CIM₉₀ dos compostos nitroimidazóis em 7 isolados clínicos sensíveis, monorresistentes a RFP (RR-TB) e multirresistentes (MDR-TB);
- Determinar o Índice de Citotoxicidade (IC₅₀) dos compostos nitroimidazóis em fibroblastos pulmonares MRC-5, macrófagos murinos J774A.1 e células de hepatocarcinoma Hep-G2;
- Determinar o Índice de Seletividade (IS) dos compostos, a fim de estabelecer os mais promissores para testes posteriores, respeitando um valor de IS maior ou igual a 10 ($IS = IC_{50}/CIM_{90}$);
- Determinar o espectro de ação dos compostos em diferentes cepas bacterianas Gram-positivas e negativas, assim como em *Candida albicans*;
- Determinar a atividade dos compostos em *M. tuberculosis* em ambiente intramacrofágico;
- Avaliar a toxicidade aguda dos compostos nitroimidazóis em *Galleria mellonella*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese dos derivados nitroimidazóis

Todos os derivados nitroimidazóis foram sintetizados e fornecidos pelo grupo do Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, do laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (fig. 5). Foram preparadas, aliquotadas e congeladas soluções estoques para todos os compostos a 10 mg/mL, em DMSO.

Figura 7- Esquema de síntese dos compostos derivados



Fonte: Guilherme Fernandes – Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, 2021

3.2 Cepas de *M. tuberculosis*

A cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) utilizada para os experimentos foi cultivada em meio Middlebrook 7H9 (Sigma®), suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) a 37 °C e 5% CO₂.

Para os testes de REMA (*Rezasurin microtiter assay*) com isolados clínicos sensíveis, RR-TB e MDR-TB, foram utilizadas cepas oriundas de pacientes do Instituto Clemente Ferreira, obtidas entre os anos de 2007 e 2009.

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

A atividade anti-*M. tuberculosis* dos compostos nitroimidazóis foi determinada pelo método REMA descrito por Palomino e colaboradores (2002). As soluções-estoques dos mesmos foram diluídas em Middlebrook 7H9 (Sigma®) suplementado com OADC, para a obtenção de concentrações de 0,09-25 µg/mL. RFP, INH, MOX e Pretomanida foram utilizadas como controle do experimento em concentrações de 0,004-1,0 µg/mL. Uma suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv, foi cultivada até a obtenção de uma turbidez equivalente à da escala padrão McFarland nº. 1 e ajustada para 10⁵ UFC/mL. Após, 100 µL do inóculo padronizado foi adicionado a cada poço da microplaca de 96 poços, juntamente com 100 µL dos compostos nas concentrações descritas. As microplacas foram incubadas em estufa durante 7 dias a 37 °C e, após sete dias, adicionou-se 30 µL de resazurina (Sigma®) a 0,01%, solubilizada em água estéril. A fluorescência dos poços foi lida após 24 horas utilizando-se o leitor de placas Cytation 3 (Biotek®) no comprimento de onda de 530/590 nm de emissão e excitação respectivamente. A Concentração inibitória mínima (CIM₉₀) foi definida como a menor concentração na qual houve 90% de inibição do crescimento das bactérias, e os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas. (PALOMINO et al., 2002).

3.4 Ensaios de citotoxicidade com linhagens de células macrófágicas (J774A.1), fibroblastos pulmonares (MRC-5) e células de hepato carcinoma (Hep-G2)

A linhagem de macrófagos murinos J774A.1 foi obtida no do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ 0121), assim como as células de fibroblasto humano (BCRJ 0180) e as células epiteliais de hepato carcinoma (BCRJ 0103).

3.5 Determinação do Índice de Citotoxicidade (IC₅₀)

Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células MRC-5 (ATCC CCL-171) e Hep-G2 (ATCC HB-8065) cultivadas em meio DMEM (Vitrocell®) e células J774A.1 (ATCC TIB-67), cultivadas em meio RPMI (Vitrocell®), ambos os meios enriquecidos com 10% de soro fetal bovino e acrescidos de sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L). As células foram cultivadas incubadas à 37 °C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular. Um volume de 2,5 x10⁵ células/mL de MRC-5, Hep-G2 e J774A.1 foram semeados em microplacas de 96 orifícios distintas, com volume final de 100 µL, incubadas por 24 horas à 37 °C com 5%

CO₂ para permitir a adesão celular. Após este período, os compostos derivados foram acrescentados às placas num intervalo de diluição de 0,09-25µg/mL com incubações de 24 horas à 37 °C e 5% de CO₂, em meios ausentes de antibiótico e antimicótico. Como controle de experimento o fármaco Rifampicina (Sigma®) foi utilizado para comparação de citotoxicidade, enquanto que uma coluna da placa foi utilizada como controle de viabilidade celular, havendo apenas células em meio de cultivo. Após esse período, foram adicionados 50 µL de 0,01% de resazurina e, após 3 horas, a leitura de fluorescência foi realizada utilizando-se o leitor Synergy H1 (Biotek®) no comprimento de onda de 530/590 nm de emissão e excitação respectivamente. O valor de IC₅₀ foi definido como a maior concentração dos compostos em que 50% das células permaneceram viáveis, e os experimentos foram realizados em triplicatas independentes (PAVAN et al., 2010).

3.6 Determinação do Espectro de Atividade

As bactérias testadas para espectro antibacteriano dos compostos foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella entérica* sorotipo Typhi (ATCC 14028), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), enquanto a levedura *Candida albicans* (ATCC 90028) foi testada para determinação do espectro de atividade antifúngica.

Os cultivos bacterianos foram realizados em meio Luria-Bertani (LB) sólido, havendo repiques semanais. A cada três semanas os cultivos eram reiniciados com suspensão bacteriana estoque e mantidos a -80° C, com a finalidade de se evitar possíveis contaminações e resistência. Como controle, um antibiótico de amplo espectro do grupo dos aminoglicosídeos, a gentamicina, foi utilizada. 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 20 horas em agitador orbital a 0,4 g (200 rpm) e 37 ° C. Foram então diluídas até 5x10⁵ UFC/mL e 100 µL de inóculo foram plaqueados em microplacas de 96 poços e adicionados a outros 100 µL dos compostos em concentrações de 0,39-100 µg/mL. Após incubação a 37 ° C por 24 horas, foi realizada a leitura da absorbância a 600nm em leitor de placas Synergy H1 (Biotek®). O resultado foi demonstrado como a média de três ensaios independentes (CAMPOS, 2018).

A levedura foi cultivada em placa de ágar Sabouraud-dextrose e incubada a 37 ° C por 48 h para crescimento. As colônias selecionadas foram suspensas em 20 mL de caldo Sabouraud e novamente incubadas por mais 48 h de forma estática. Para o experimento, determinou-se a

concentração de leveduras por absorbância a 530 nm, ajustando-a para valores de absorbância entre 0,1 e 0,15, correspondente a 1×10^6 UFC/ mL. (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2001).

O inóculo foi diluído para 2×10^3 UFC/mL para utilização, e foram adicionados 100 µL em placa de 96 poços juntamente ao caldo Sabouraud com os compostos, em diluição seriada de 0,39- 100 µg/ mL. Como controle, a Anfotericina B foi utilizada. Após 48 h de incubação nas mesmas condições anteriores, foi feita a aplicação de 50 µL de rezasurina a 0,01% e leitura de fluorescência a 530/590 nm em leitor de placas Synergy H1 (Biotek®).

3.7 Ensaio de sobrevivência bacteriana em ambiente intramacrofágico

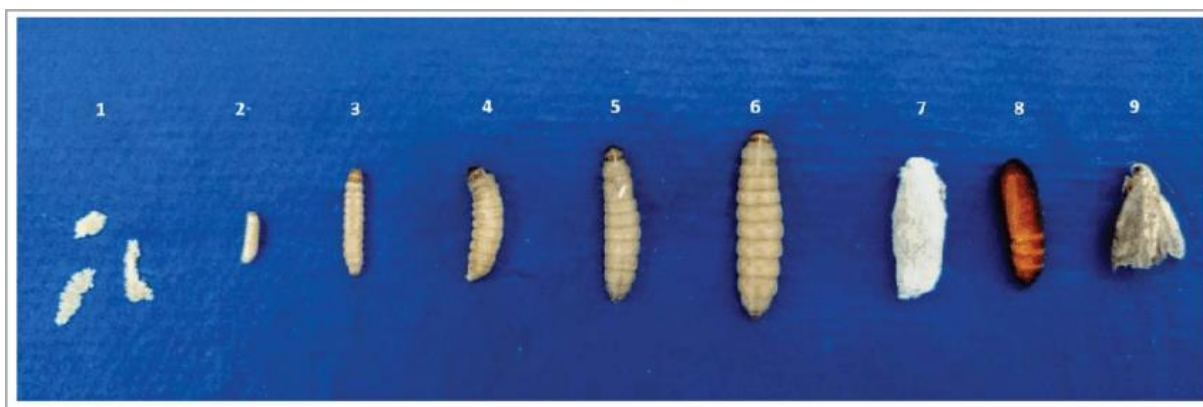
A atividade intramacrofágica dos compostos derivados nitroimidazóis foi determinada pela infecção *in vitro* de macrófagos por *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Previamente, foi realizado ensaio de citotoxicidade por 72 horas para garantir que a concentração testada permitisse a viabilidade de 100% dos macrófagos. Assim, uma quantidade de 5×10^5 cel/mL de macrófagos foi semeada em poços de uma placa de 24 poços e incubada por 24 horas a 35 °C, atmosfera a 5 % CO₂ até a obtenção de confluência celular. Após este período foi realizada a fagocitose, com a adição de um inóculo de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL de *M. tuberculosis*, e as placas foram incubadas novamente em condições ideais por 2 horas. Em seguida, foi adicionado 1 mL de amicacina a 200 mg/ mL com o objetivo de lisar as bactérias ainda presentes na parte externa das células, e as placas incubadas novamente por mais 2 horas. Por fim, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão PBS 1x e pH 7,4 para remoção das possíveis bactérias que não foram fagocitadas no tempo de incubação.

A análise da atividade dos compostos ocorreu após a adição de 1 mL de solução dos derivados nitroimidazóis diluídos em meio RPMI, em valores iguais ou múltiplos à sua CIM₉₀. Como controle, foi utilizada RFP e pretomanida nas mesmas condições. Após 3 dias, os poços de controle denominados T3 (tempo de 3 dias de experimento) contendo somente macrófagos infectados, e os poços tratados com os compostos, foram lisados com a solução de Triton 0,1% e a solução resultante foi diluída em concentrações de 1×10^{-2} , 1×10^{-3} e 1×10^{-4} , respectivamente, e plaqueados em placas de Petri com três divisórias em meio 7H11 (Sigma®), e estas foram incubadas em estufa a 35 °C, atmosfera a 5 % CO₂.

3.8 Avaliação da toxicidade aguda em *Galleria mellonella*

As larvas de *G. mellonella* foram utilizadas em seu estágio larval final (fig. 8). Para o cálculo da concentração dos compostos derivados e determinação da Dose Letal para 50% da população testada (DL_{50}), foi utilizado o mesmo cálculo para camundongos BALB/c segundo o *Oecd Guideline for Testing of Chemicals* (Oecd, 2001). Grupos de dez larvas foram selecionadas aleatoriamente, cada uma pesando 0,2-0,3 g e receberam uma dose única de 2.000 mg/Kg de peso corpóreo. A administração de 10 μ L foi feita na pró-pata traseira esquerda utilizando seringa de insulina (Kavanagh & Fallon, 2010). O grupo controle contendo 10 larvas recebeu o veículo utilizado como solvente da substância (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada), e outro grupo de 10 larvas recebeu PBS 1x como controle de trauma. As larvas foram incubadas no escuro a 30°C em placas de petri e observadas a cada 24 horas por 5 dias em relação a sua mortalidade. Foram consideradas como mortas aquelas que estiveram imóveis, sofreram melanização, não se orientaram ou quando colocadas de costas não responderam a estímulos.

Figura 8– Estágios larvais da *G. mellonella*. O ensaio é realizado entre os estágios 5 e 6.



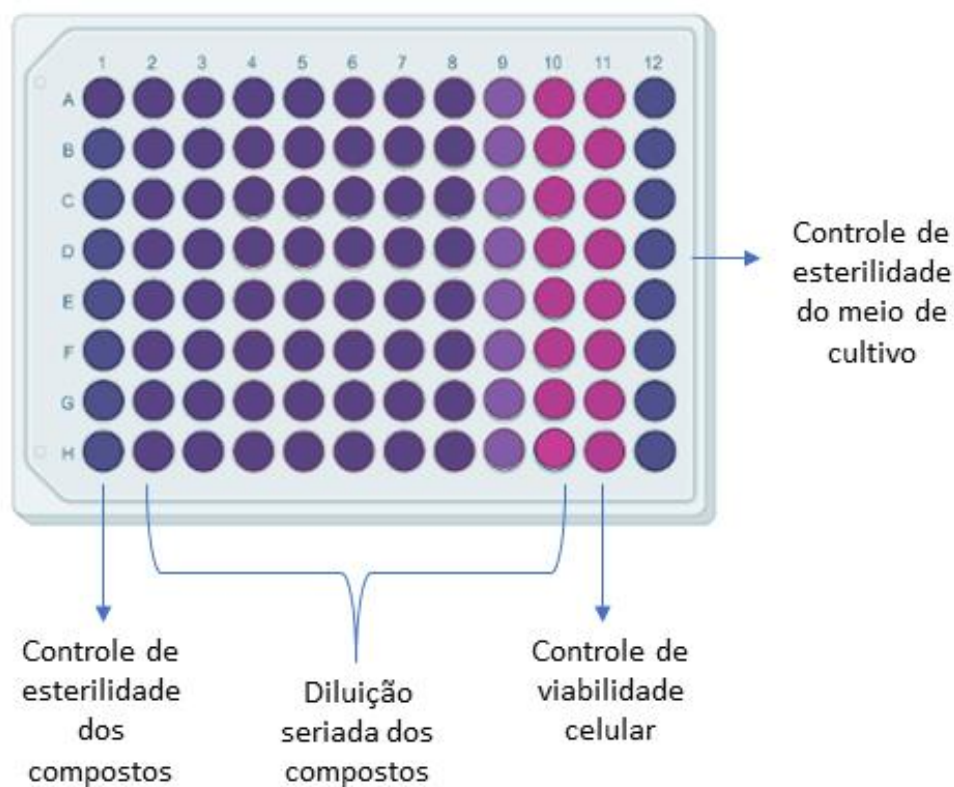
Fonte: Jorjão et al., 2018

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) dos compostos derivados nitroimidazóis em *M. tuberculosis* em estado metabólico ativo

O método de microtitulação da resazurina em placa (REMA) é um método barato, eficaz, confiável e rápido, onde ocorre a oxirredução da resazurina, que em outrora era conhecida como Alamar Blue. A resazurina, corante azul e pouco fluorescente, é reduzida a resorufina, um corante rosa que emite alta fluorescência, através da liberação de oxigênio pelas células viáveis presentes no meio (PALOMINO et al., 2002). Este corante ou revelador é muito utilizado, não somente para determinação da viabilidade celular de procariotos, mas também de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

Figura 9 - Microplaca de 96 poços esquematizada após a aplicação e redução da resazurina em contato com *M. tuberculosis*.



Fonte: Autoria própria

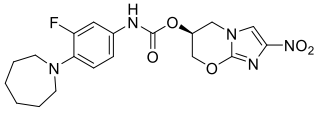
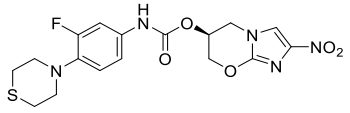
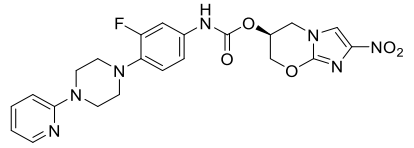
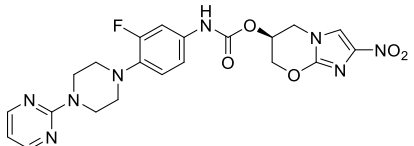
Na Tabela 2 podemos observar os resultados da CIM₉₀, a qual foi determinada através do REMA dos compostos derivados nitroimidazóis frente a cepa sensível H₃₇Rv. O valor de CIM₉₀ de cada composto foi obtido pela média dos resultados de CIM₉₀ de três ensaios

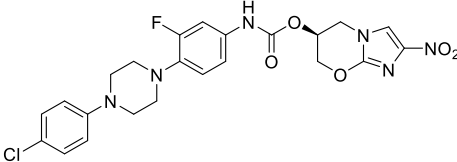
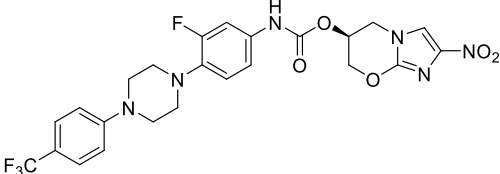
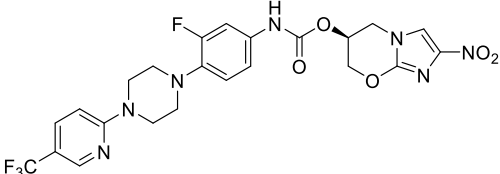
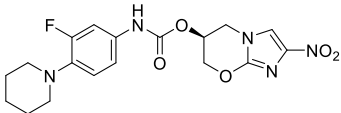
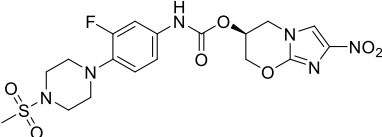
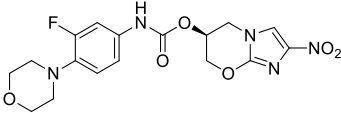
independentes. Como controle dos ensaios foram utilizados a RPF, INH, amicacina, moxifloxacina e pretomanida, fármacos já estabelecidos para a terapia da TB, seja ela sensível ou, em pacientes que apresentem MDR ou XDR-TB.

Foram considerados compostos promissores, com atividade anti-*M. tuberculosis*, aqueles que apresentaram valores de CIM₉₀ < 5 µM (ORME, 2001). Diante dos resultados obtidos, todos os compostos apresentaram excelente atividade contra *M. tuberculosis*, muito abaixo do valor limite definido, superando até mesmo, alguns dos fármacos já em uso na terapia de pacientes com TB. Com a exceção do composto 19-10, todos os outros apresentaram valores de CIM₉₀ menores que 0,5 µM, concentração essa que é muito menor que do fármaco de primeira linha, INH e o de segunda linha, MOX.

Quando observamos a estrutura química dos compostos, notamos que a diferença entre esses se dá apenas em alguns anéis aromáticos e radicais. Entretanto, quando se analisa a estrutura do composto 19-10, é observado a presença de uma sulfonamida, a qual não está presente em nenhum dos outros nove compostos. Esta ligação, portanto, precisa ser melhor analisada quanto a sua atividade perante a ação bacteriostática ou bactericida em cepas sensíveis de *M. tuberculosis*, podendo sugerir a influência de suas propriedades físico-químicas. Entretanto, ainda assim, o composto 19-10 se mostra muito promissor em sua efetividade contra *M. tuberculosis*.

Tabela 2 - Resultados de Concentração Inibitória Mínima₉₀ sobre atividade dos compostos contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv

CIM ₉₀ (µM)		H ₃₇ Rv
Compostos		
		Média ± Desvio
	19-01	0,34 ± 0,18
	19-02	0,23 ± 0,00
	19-03	0,20 ± 0,00
	19-04	0,20 ± 0,00

CIM ₉₀ (μM)		
Compostos		H ₃₇ Rv
		Média ± Desvio
	19-05	0,19 ± 0,00
	19-07	0,18 ± 0,00
	19-08	0,18 ± 0,00
	19-09	0,24 ± 0,00
	19-10	1,63 ± 0,04
	19-13	0,32 ± 0,09
RFP		0,12 ± 0,09
INH		2,20 ± 0,43
AMK		0,47 ± 0,80
MOX		1,11 ± 0,50
PRET		0,99 ± 0,45
BZ8		0,10 ± ND*

* valor retirado da fonte (DOS SANTOS FERNANDES et al., 2017)

AMK = amicacina; MOX = moxifloxacino; PRET = pretomanida

A Tabela 3 traz resultados dos ensaios realizados em triplicata e independentes com sete isolados clínicos RR-TB, MDR-TB e isolados clínicos sensíveis (SS), oriundos do Instituto Clemente Ferreira (C.F.). A concentração máxima para determinação de compostos promissores para isolados clínicos resistentes foi de 5 μM.

Como é possível observar, os derivados nitroimidazóis tiveram atividade excelente em todos os isolados com alguma resistência como um todo, apresentando valores de CIM₉₀

extremamente baixos, como 0,18 μM . Seguindo as atualizações da OMS, onde não é mais recomendado a administração de fármacos injetáveis de segunda linha para o tratamento de pacientes com TB causada por *M. tuberculosis* resistentes, não foram utilizados fármacos deste segmento como controle de experimento, somente fármacos de primeira linha (RFP e INH) e de segunda linha incluídos no Grupo A (MOX e Pretomanida).

Analisando os valores da CIM_{90} dos os compostos uma a uma, por cada bactéria, o isolado 110, que é MDR-TB, apresentou valor de CIM menores que 0,31 μM . O isolado 85, com resistência somente a RFP, também demonstrou sensibilidade aos compostos, tendo o composto 19-07 atingido CIM_{90} mais baixa entre todos, de 17 μM . Os isolados 158 e 46, classificados através dos resultados obtidos dos controles da terapia como sensíveis, de fato se mostraram sensíveis a todos os compostos, com CIM que variaram de 0,08 a 1,59 μM , mas não podemos compará-las com cepas ATCC sensíveis, pois mesmo que demonstrem sensibilidade aos antibióticos controle e aos compostos em estudo, estas cepas já sofreram represálias do sistema imune do paciente acometido pela tuberculose, o que naturalmente causa alterações em sua resistência natural. Assim, foi possível comparar a CIM_{90} entre eles, no qual a maioria dos compostos apresentou valores menores que a CIM_{90} da RFP (1,11 μM) e muito próximos as da INH, com valor de 0,12 μM contra 0,19 μM do composto 19-05.

O isolado clínico 79 foi o que mais demonstrou resultados de resistência, sendo sensível apenas aos compostos 19-01, 19-03, 19-04, 19-05 e 19-07. O isolado 100 foi sensível a todos os compostos, e o isolado 104 demonstrou ser susceptível aos compostos 19-01, 19-02, 19-04, 19-05, 19-08, 19-10 e 19-13.

Observando o comportamento muito semelhante entre compostos, através dos resultados das concentrações inibitórias em cepa ATCC e isolados clínicos, observamos que todos os compostos possuíam excelente atividade contra o *M. tuberculosis*, e, portanto, todos os 10 compostos prosseguiram para o ensaio de citotoxicidade.

Tabela 3 - Resultados de Concentração Inibitória Mínima₉₀ de compostos derivados nitroimidazóis em isolados clínicos resistentes de *M. tuberculosis*

Compostos	CIM ₉₀ (µM) de cepas resistentes						
	CF 110	CF 85	CF 158	CF 46	CF 79	CF 100	CF 104
	MDR	RR	SS	SS	MDR	MDR	MDR
19-01	0,20	0,43	0,23	1,59	1,40	0,23	0,23
19-02	0,23	0,23	0,33	0,23	5,56	0,24	1,50
19-03	0,20	0,20	0,20	0,20	0,76	0,23	5,35
19-04	0,20	0,20	0,30	0,20	3,21	0,62	3,08
19-05	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	4,46
19-07	0,18	0,38	0,37	0,18	1,18	0,20	7,99
19-08	0,18	0,18	0,18	0,18	21,48	0,43	0,20
19-09	0,24	0,17	0,24	0,31	43,11	0,18	44,55
19-10	1,08	3,32	1,03	1,36	15,99	0,63	1,19
19-13	0,31	0,45	0,58	0,24	6,32	2,02	3,97
RFP	> 25	18,23	1,18	1,11	>25,00	>25,00	>25,00
INH	15,25	0,12	0,12	0,12	>25,00	>25,00	>25,00
MOX	1,53	0,10	0,10	0,08	ND	ND	ND
PRET	ND	0,03	0,08	0,02	ND	ND	ND

CF– Instituto Clemente Ferreira + número de identificação da cepa. MDR – Multidroga resistente. RR – Rifampicina resistente. SS. Sensível. ND – Não Determinado.

4.2 Determinação do Índice de Citotoxicidade (IC₅₀)

O ensaio de citotoxicidade celular (IC₅₀) tem como finalidade avaliar a maior concentração dos compostos estudados que seja capaz de permitir a viabilidade de 50% das células. As três linhagens celulares escolhidas para a realização do ensaio de IC₅₀ foram escolhidas baseadas na atividade do *M. tuberculosis* e na metabolização do composto quando administrado *in vivo*.

Ensaios prévios realizados com o BZ8 em células MRC-5 (fibroblastos pulmonares) resultaram em valores de 519 µM, o que representa uma baixa toxicidade deste composto perante a esta linhagem celular (DOS SANTOS FERNANDES et al., 2017). Com isso, a realização do ensaio de IC₅₀ com MRC-5 serve de comparativo para avaliar se há um aumento, uma diminuição ou uma estática dos valores resultantes dos compostos hibridizados. A linhagem de fibroblastos pulmonares foi utilizada devido ao local de infecção inicial pelo *M.*

tuberculosis. Os pulmões são majoritariamente afetados pela infecção, sendo o local de maior reprodução e reservatório microbiano, sendo a porta de entrada do bacilo ao organismo, e por isso é uma linhagem de interesse.

A Hep-G2 é uma célula epitelial de hepatocarcinoma humano. É uma célula metabolizadora, o que a torna ideal para avaliação dos metabólitos dos compostos em estudo, pois é capaz de demonstrar *in vitro*, algumas funções do parênquima hepático normal, visando verificar se após o contato com as células, o produto resultante pode ser tóxico às células ou não (NOWROUZI et al., 2010).

Já os macrófagos (J774.1-A) são as primeiras células de defesa as quais o bacilo se depara quando infecta seu hospedeiro. Muitos estudos demonstram que a atividade *in vitro* em macrófagos apresenta grande lacuna entre os resultados *in vivo*. Entretanto, ainda que de forma a entender a interação entre célula e patógeno de maneira simplista, alguns receptores e quimiocinas são liberados pela célula que podem resultar em respostas interessantes para o estudo (ANDREU et al., 2017).

Na tabela 4 estão expressos os resultados da concentração dos compostos frente as três linhagens, nas quais 50% das células permaneceram viáveis no tempo de 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e os resultados demonstrados através da média e desvio padrão dos experimentos. Como pode ser observado, os valores de concentração foram seguros, sendo muito acima dos valores de CIM₉₀ obtidos com os isolados clínicos de *M. tuberculosis* testados.

Todos os compostos apresentaram valores de IC₅₀ acima de 100 µM, com exceção do composto 19-07 na linhagem de MRC-5, que resultou em 92,50 µM, ainda sendo um valor excelente. Diante disso, foi constatado que os valores de IC₅₀ de todos os 10 compostos estudados eram seguros e poderiam prosseguir para os próximos ensaios.

Tabela 4 - Resultados de Índice de Citotoxicidade₅₀ sobre atividade dos compostos frente a três linhagens celulares

Compostos	IC ₅₀ (µM)		
	J774.1-A	MRC-5	HEP-G2
	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
19-01	141,58 ± 1,87	215,27 ± 22,55	476,87 ± 0,00
19-02	142,91 ± 11,82	196,13 ± 41,59	472,37 ± 0,00
19-03	128,70 ± 5,72	400,92 ± 20,88	413,05 ± 0,60

Compostos	IC ₅₀ (μM)		
	J774.1-A	MRC-5	HEP-G2
	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
19-04	124,04 ± 7,55	360,08 ± 163,06	412,88 ± 0,00
19-05	118,90 ± 4,66	247,03 ± 125,46	386,92 ± 0,00
19-07	106,58 ± 6,85	92,50 ± 90,00	322,88 ± 9,95
19-08	116,66 ± 2,74	111,22 ± 56,90	347,71 ± 13,55
19-09	118,75 ± 15,28	244,49 ± 73,25	458,72 ± 10,94
19-10	127,33 ± 4,66	219,68 ± 90,19	384,97 ± 25,92
19-13	142,36 ± 27,21	161,17 ± 22,36	441,74 ± 23,80
RFP	64,47 ± 0,44	243,03 ± 0,00	243,03 ± 0,00

4.3 Determinação o Índice de Seletividade (IS) das moléculas afim de estabelecer as mais promissoras para testes posteriores

O Índice de Seletividade (IS) é determinante para que os próximos ensaios aconteçam. O IS é a razão entre o quão tóxica e o quão efetiva um composto pode ser (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021). O cálculo do IS foi realizado utilizando a fórmula:

$$SI = \frac{IC_{50}}{CIM_{90}}$$

Onde IC₅₀ representa a concentração do derivado em estudo que 50% das células permaneceram viáveis em contato com o composto por um período determinado de tempo, enquanto que CIM₉₀ é a concentração inibitória mínima dos compostos que foi capaz de inibir 90% do crescimento microbiano. O valor resultante dessa divisão que pode ser considerado biologicamente eficaz deve ser igual ou acima de 10 (CAAMAL-FUENTES et al., 2011).

Diante disso, como mostra a tabela 5, obteve-se valores muito acima de 10, demonstrando que estes compostos são potentes em baixas concentrações contra a micobactéria e pouco tóxicos às células avaliadas. É muito comum que, nesta etapa, muitos dos compostos estudados não continuem para as próximas etapas por não atingirem o coorte desejado. Entretanto, neste caso, todos os 10 compostos, mais uma vez, foram selecionados para dar prosseguimento ao projeto.

Tabela 5 - Valores do Índice de Seletividade baseados no cálculo de IC₅₀ / CIM₉₀ das três linhagens celulares e do *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Índice de Seletividade			
Compostos	J774.1-A	MRC-5	HEP-G2
19-01	416	633	1403
19-02	621	853	2054
19-03	644	2005	2065
19-04	620	1800	2064
19-05	626	1300	2036
19-07	592	514	1794
19-08	648	618	1932
19-09	495	1019	1911
19-10	78	135	236
19-13	445	504	1380

4.4 Determinação do Espectro de Atividade

A tabela 6 mostra os valores de CIM₉₀ em 4 espécies bacterianas diferentes, sendo elas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhi e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como resultados frente a um fungo comumente encontrado na microbiota humana, a *Candida albicans*.

Tabela 6 - Resultados de Concentração Inibitória Mínima dos derivados nitroimidazóis contra a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em *Candida albicans*

CIM ₉₀ do Espectro de Ação (µM)					
Compostos	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Salmonella</i> Typhi (ATCC 14028)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)
19-01	59,61	59,61	59,61	59,61	178,83
19-02	59,05	59,05	59,05	44,28	236,18
19-03	51,72	38,79	51,72	29,10	206,87
19-04	51,61	51,61	51,61	27,42	206,44
19-05	48,37	48,37	48,37	48,37	48,37

CIM ₉₀ do Espectro de Ação (µM)					
Compostos	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Salmonella Typhi</i> (ATCC 14028)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)
19-07	45,42	45,42	45,42	25,55	22,71
19-08	45,34	45,34	45,34	45,34	181,36
19-09	61,68	61,68	61,68	61,68	246,73
19-10	51,61	51,61	51,61	29,04	206,44
19-13	61,38	61,38	61,38	38,36	138,10
Gentamicina	1,90	0,63	0,95	0,47	-
Anfotericina B	-	-	-	-	1,45

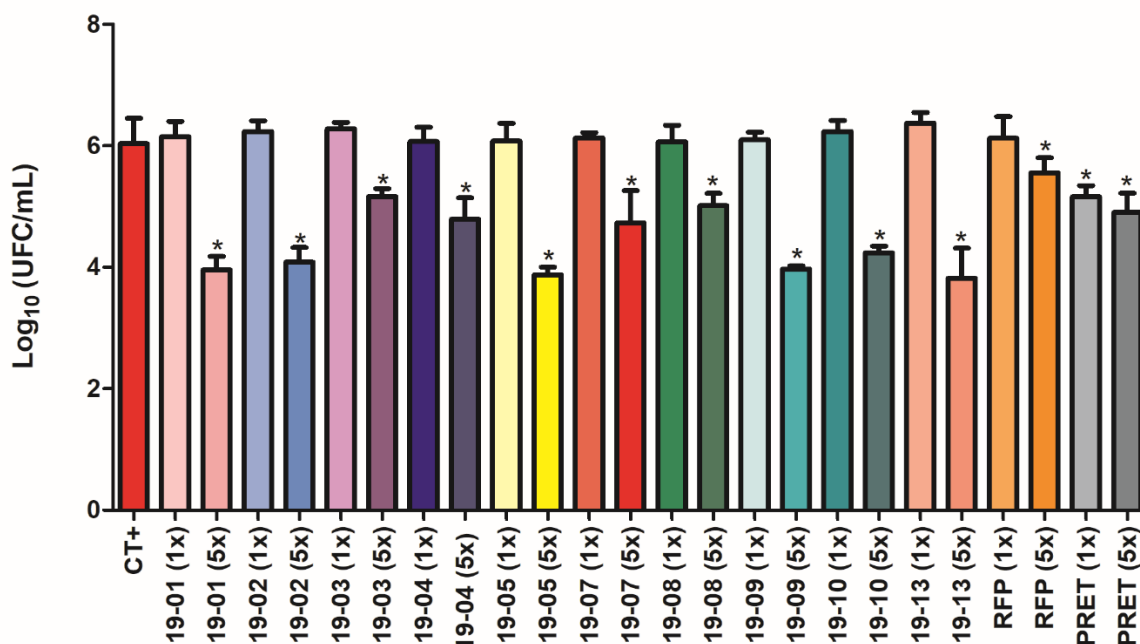
Segundo os dados obtidos, os 10 compostos avaliados necessitam de uma concentração muito alta para atingir a concentração inibitória mínima (CIM₉₀) contra estas espécies bacterianas e a espécie fúngica, significando um espectro de ação estreito contra *M. tuberculosis*.

4.5 Ensaio de sobrevivência intramacrofágica

Um ensaio preliminar ao ensaio principal da avaliação do desempenho dos compostos em bactérias intracelulares deve ocorrer, a fim de estabelecer se a concentração dos compostos a ser usada não prejudicará as células durante o período do experimento de infecção intramacrofágica. Foi realizada uma triplicata biológica de IC₅₀ e IC₉₉ em macrófagos por um período de 72 h.

O tempo de 72 h dos compostos em contato com os macrófagos é devido ao tempo de ensaio intramacrofágico também ser de 72 h. Como resultado, obteve-se valores acima de 75,18 µM para o IC₅₀, e 1,7 µM para IC₉₉, onde essas concentrações altas dos compostos ainda foram seguras no período de três dias, e, portanto, todos os compostos demonstraram-se aptos.

Figura 10- Eficácia dos compostos na inibição do crescimento de *M. tuberculosis* em ambiente intramacrofágico



- Significativamente diferente do controle sem tratamento (CT+), de acordo com 1 way ANOVA com pós-teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls ($p < 0.05$). CT+ – controle de crescimento intramacrofágico sem tratamento após 3 dias; (1x) – concentração do composto a 1 vez a concentração da CIM₉₀; (5x) - concentração do composto a 5 vezes a concentração da CIM₉₀.

O gráfico apresentado está em ordem de numeração crescente de composto, com três controles: o controle de crescimento dos bacilos em ambiente intramacrofágico no período de três dias dos macrófagos infectados, entretanto sem tratamento por antibióticos (CT+), os macrófagos infectados tratados com RFP, e os macrófagos infectados tratados com Pretomanida. Todos os compostos foram testados na concentração inibitória mínima de 90%, estipulada anteriormente no ensaio de REMA realizado com cepas ATCC.

Observando os resultados obtidos nas duas concentrações avaliadas, nota-se uma inibição do crescimento bacteriano intracelular de até dois logs entre a primeira concentração (de 1x) e a última (de 5x), quando comparados ao controle CT+, válido para os dez compostos avaliados. Tal comportamento demonstra efetividade dos compostos de maneira intracelular e dose dependente, com uma redução, portanto, de 99% no crescimento micobacteriano intracelular.

Quando a comparação dos compostos com o controle de fármaco RFP é feita, observamos que a RFP também se comporta de maneira dose dependente, e que seus resultados

nos estudos com o bacilo em ambiente intramacrofágico em sua CIM₉₀ são estatisticamente semelhantes ao dos compostos derivados, sendo um ponto positivo para o ensaio essa semelhança.

Ao observarmos os resultados do fármaco Pretomanida, vemos que na concentração de 1x e 5x de sua CIM₉₀, o fármaco se comporta de forma muito semelhante, sendo estatisticamente diferente do controle de crescimento positivo em ambas as concentrações. Entretanto, quando comparado aos compostos híbridos de BZ8 e Pretomanida 19-01, 19-02, 19-05, 19-10 e 19-13, a atividade dos compostos é mais efetiva em reduzir o crescimento intramacrofágico do que o fármaco sozinho.

Dessa maneira, a avaliação da atividade intramacrofágica dos compostos demonstrou efetividade promissora, comparável e até mesmo superior ao fármaco padrão ouro da terapia, a RFP, e do fármaco utilizado como parte híbrida, pretomanida. O desempenho muito semelhante entre os compostos foi novamente notado, tendo se tornado um padrão destes derivados ao longo dos ensaios transcorridos.

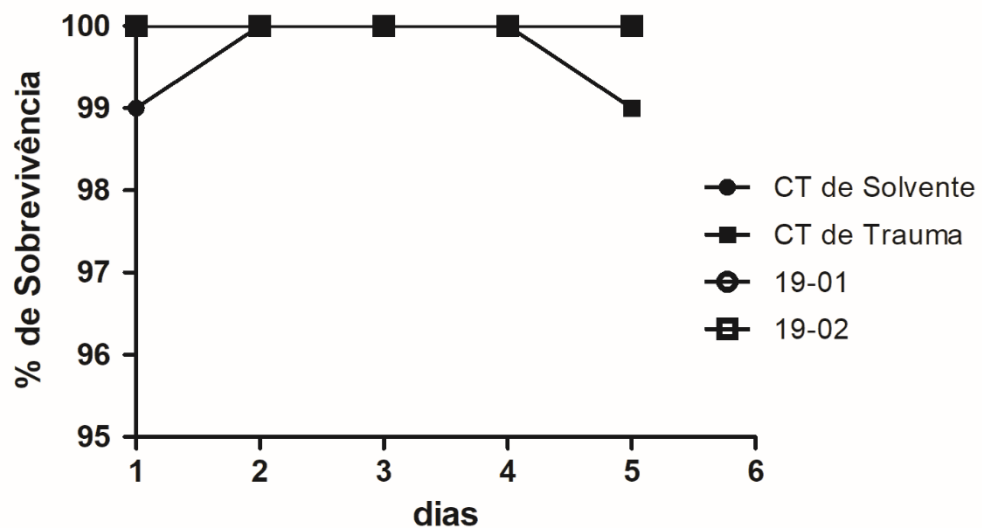
4.6 Avaliação da Toxicidade Aguda em *Galleria mellonella*

A escolha pelas larvas de *Galleria mellonella* para realização do ensaio de toxicidade aguda dos compostos foi feita devido a vários fatores. O uso do inseto não implica a necessidade de aprovação de Comitês de Ética, despense gastos inferiores aos ensaios animais que utilizam mamíferos, e não necessitam de alocações e equipamentos especiais além dos já comumente encontrados em laboratórios NB-2, além do tempo de ensaio ser rápido, ideal para um ensaio de mestrado, como o em questão (IGNASIAK; MAXWELL, 2017).

O ensaio foi realizado utilizando dois dos dez compostos, devido a pouca massa restante dos mesmos, que nos impediu de chegar à concentração ideal para a dose máxima descrita pela metodologia. Uma segunda dificuldade encontrada durante a realização do ensaio, foi a baixa solubilização dos compostos em veículos pouco lipossolúveis, uma vez que as *Gallerias mellonellas* são larvas que se alimentam de grande quantidade de carboidratos e gorduras e, portanto, possuem grande afinidade em sua estrutura corporal por substâncias lipofílicas. Tal fato poderia prejudicar o resultado do ensaio, uma vez que o veículo sendo muito lipossolúvel haveria a chance de causar uma intoxicação na larva, levando-a a morte, comprometendo o real motivo deste acontecimento, que não seria o efeito colateral do composto em estudo. Com isso, o composto 19-01 foi solubilizado na concentração ideal de 2.000 mg/kg de peso corpóreo

médio do grupo de larvas, enquanto que o composto 19-02 só foi possível ser solubilizado na metade dessa concentração, a de 1.000 mg/kg de peso corpóreo.

Figura 11 – Porcentagem de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* em 5 dias de tratamento na concentração de 2.000 mg/kg para 19-01 e 1.000 mg/kg para 19-02



*CT – Controle; CT Trauma – grupo de larvas as quais somente receberam a aplicação de solução PBS 1x, para que a avaliação do trauma causado pela agulha fosse feita como um possível causador de morte; CT de Solvente – grupo de larvas as quais receberam somente o veículo dos compostos estudados, para avaliação de uma possível reação de toxicidade pela substância solvente.

Figura 12- Grupo de larvas do composto 19-01 após 24h do recebimento da dose



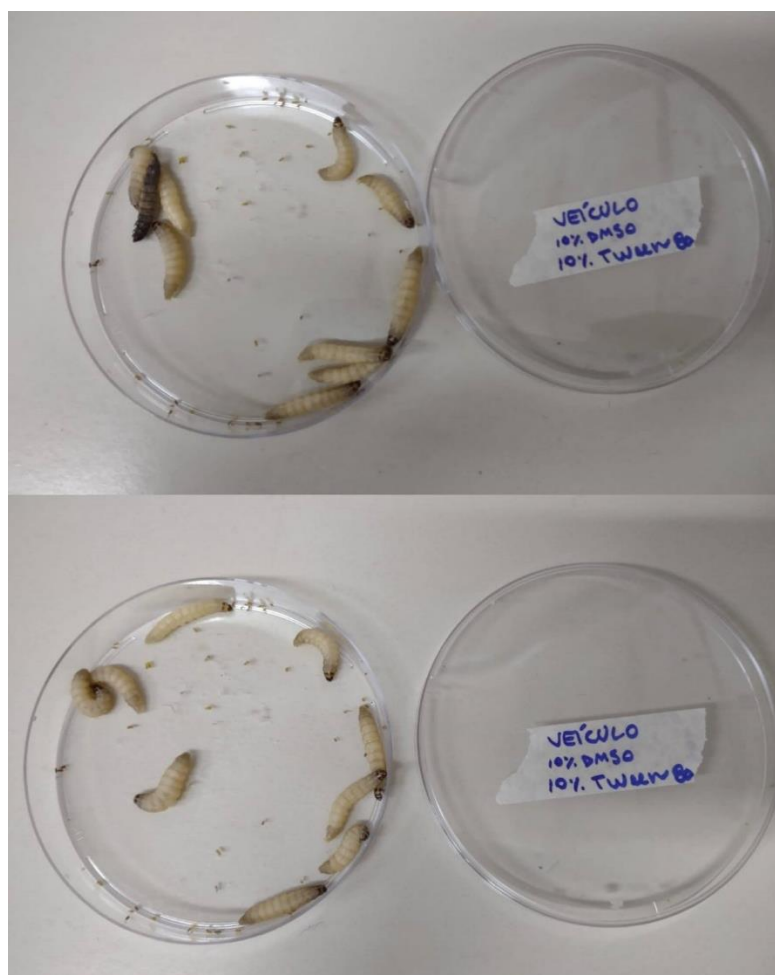
Fonte: Autoria própria

Figura 13- Grupo de larvas do composto 19-02 após 24h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 14- Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 24h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 15- Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 24h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 16- Grupo do composto 19-01 após 48h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 17- Grupo do composto 19-02 após 48h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 18- Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 48h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 19- Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 48h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 20- Grupo do composto 19-01 após 72h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 21- Grupo do composto 19-02 após 72h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 22- Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 72h do recebimento da dose



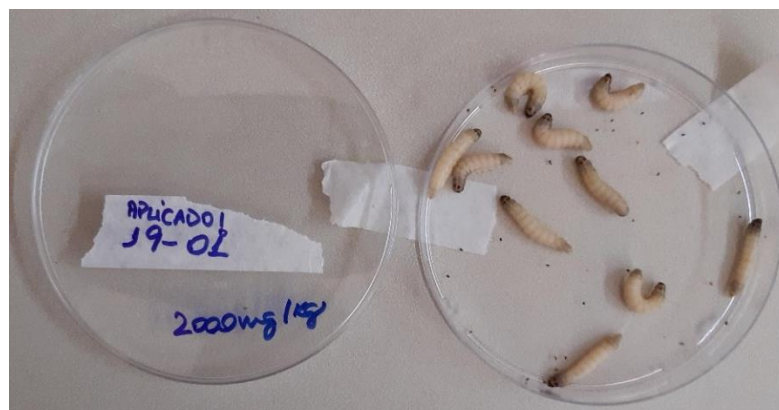
Fonte: Autoria própria

Figura 23- Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 72h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 24- Grupo do composto 19-01 após 96h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 25- Grupo do composto 19-02 após 96h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 26- Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 96h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 27- Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 96h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 28- Grupo do composto 19-01 após 120h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 29- Grupo do composto 19-02 após 120h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 30- Grupo Controle do Solvente (10% de DMSO, 10% tween 80 e água destilada) após 120h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Figura 31- Grupo Controle de Trauma (PBS 1x) após 120h do recebimento da dose



Fonte: Autoria própria

Os resultados foram analisados de forma qualitativa, através da observação da incidência ou não de mortes com o passar dos dias estipulados. Como foi possível observar, após 24 h da aplicação dos compostos e controles, o grupo Controle de Solvente apresentou uma morte, enquanto que nos grupos de teste e de Controle de Trauma não houveram mortes. Com o passar das 48 h, uma larva do grupo de teste do composto 19-02 avançou em sua evolução larval, o que não alterou de forma significativa nossos resultados, pois tal acontecimento é sinal de que as larvas permanecem viáveis após a administração do composto

e aptas a continuarem seu ciclo de vida normalmente. Ao final do experimento, durante o quinto dia (120 h), uma larva do grupo Controle de Trauma foi caracterizada como morta, sem motivo de morte aparente.

Com isso, utilizando-se da maior concentração da Dose Letal estipulada, e observando-se o tempo transcorrido de ensaio, foi possível determinar que os compostos 19-01 e 19-02 nas maiores concentrações de ensaios possíveis neste método analítico de 2.000 mg/kg e 1.000 mg/kg de peso corpóreo por grupos de larvas respectivamente, não apresentaram toxicidade aguda para o modelo alternativo de *Galleria mellonella*.

5 CONCLUSÕES

A TB ainda se comporta de forma ameaçadora, tanto para as vidas que ceifa, quanto para a economia de todo o mundo, que deve despende milhões por ano para seu tratamento e cura, ação que tem sido deixada de lado diante da pandemia da COVID-19. A resistência à múltiplas drogas (MDR-TB) ou até mesmo à todas disponíveis atualmente (XDR-TB), nos traz a preocupação de buscar por novos fármacos que sejam eficientes e capazes de diminuir o tempo de tratamento e seus efeitos colaterais, diminuindo assim a desistência dos pacientes ao tratamento e a pressão seletiva que pode vir a causar tais resistências cada vez mais comuns no mundo todo.

O estigma de ser uma doença do século passado deve ser derrubado imediatamente, pois muitos dos obstáculos para a resolução desse problema tão grande de saúde pública poderiam ser ultrapassados com a ajuda de iniciativas públicas e governamentais, meios de comunicação melhor veiculados, e financiamentos adequados para a pesquisa de novos fármacos e novas vacinas.

Pudemos chegar à conclusão de que os compostos derivados nitroimidazóis estudados demonstram eficiência no combate aos bacilos *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes aos fármacos anti-TB.

Os resultados de citotoxicidade se mostraram excelentes, com valores significativamente positivos, enquanto que um comportamento de especificidade também pôde ser notado ao realizarmos os ensaios de espectro de ação, o qual nos mostrou o estreito espectro dos 10 compostos perante as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, e até mesmo a levedura *C. albicans*.

Quando o perfil intramacrofágico dos derivados nitroimidazóis é avaliado, observa-se a potência dos compostos comparável a RFP e a pretomanida, demonstrando a redução de 99% do crescimento do *M. tuberculosis* de forma intracelular, e seu desempenho sendo dose dependente.

Ao realizarmos o ensaio de Toxicidade Aguda em modelo alternativo de animal utilizando-se as larvas de *Galleria mellonella*, observamos que os compostos 19-01 e 19-02 não apresentaram risco de intoxicação no período de avaliação estipulado, o que nos leva a crer que tais compostos são seguros. Por fim, é sensato dizer que o desempenho excelente dos compostos demonstrado em todos os ensaios anteriores se provou mais uma vez presente.

Os derivados nitroimidazóis estudados se mostraram promissores, que merecem atenção e destaque para novas avaliações *in vivo* e determinações de mecanismo de ação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLIANCE, TB (org.). PRETOMANID: sponsor briefing document. ANTIMICROBIAL DRUGS ADVISORY COMMITTEE MEETING. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/127593/download>. Acesso em: 05 nov. 2021.
- ANDREU, Nuria; PHELAN, Jody; DE SESSIONS, Paola F.; CLIFF, Jacqueline M.; CLARK, Taane G.; HIBBERD, Martin L. Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1038/srep42225.
- BALABAN, Nathalie Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 441–448, 2019. DOI: 10.1038/s41579-019-0196-3. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41579-019-0196-3>.
- BANSAL, Ranju; SHARMA, Deepika; SINGH, Ranjit. Tuberculosis and its Treatment: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 58–71, 2016. DOI: 10.2174/1389557516666160823160010.
- BLASER, A. et al. Structure–Activity Relationships for Amide-, Carbamate-, And UreaLinked Analogues of the Tuberculosis Drug (6S)-2-Nitro-6-[[4-(trifluoromethoxy)benzyl]oxy]-6,7-dihydro-5Himidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824). **J. Med.Chem.**, v. 55, p. 312–326, 2012
- BROWN, Lisa; WOLF, Julie M.; PRADOS-ROSALES, Rafael; CASADEVALL, Arturo. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3480.
- CAAMAL-FUENTES, Edgar; TORRES-TAPIA, Luis W.; SIMÁ-POLANCO, Paulino; PERAZA SÁNCHEZ, Sergio R.; MOO-PUC, Rosa. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 719-24, 2011. DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.004
- CAMPANIÇO, André; HARJIVAN, Shrika G.; WARNER, Digby F.; MOREIRA, Rui; LOPES, Francisca. **Addressing latent tuberculosis: New advances in mimicking the disease, discovering key targets, and designing hit compounds**International Journal of Molecular Sciences, 2020. DOI: 10.3390/ijms21228854.
- CAMPOS, Debora Leite. **Avaliação da atividade e busca do mecanismo de ação de hidrazonas frente ao *Mycobacterium tuberculosis***. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - Unesp, Araraquara, 2018. Cap. 1

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

DENNY, W. A.; PALMER, B. D. The nitroimidazooxazines (PA-824 and analogs): structure-activity relationship and mechanistic studies. *Future Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 8, p. 1295–1304, 2010.

DOS SANTOS FERNANDES, G.F.; DE SOUZA, P. C.; MORENO-VIGURI, E, et al. Projeto, síntese e caracterização de heterociclos contendo N-óxido com atividade antitubercular de esterilização in vivo. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 60, n. 20, p. 8647-8660, Outubro de 2017. DOI: 10.1021 / acs.jmedchem.7b01332. PMID: 28968083; PMCID: PMC5677254.

DOS SANTOS FERNANDES GF, DE SOUZA, P.C.; MARINO, L.B, et al. Síntese e atividade biológica de derivados de furoxan contra *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 123, p. 523-531, Novembro de 2016. DOI: 10.1016 / j.ejmech.2016.07.039. PMID: 27508879.

DULBERGER, Charles L.; RUBIN, Eric J.; BOUTTE, Cara C. The mycobacterial cell envelope — a moving target. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 47–59, 2020. DOI: 10.1038/s41579-019-0273-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>.

FDA Briefing Document Pretomanid Tablet, 200 mg Meeting of the Antimicrobial Drugs Advisory Committee (AMDAC). p. 1–52, 2019.

FURIN, Jennifer; COX, Helen; PAI, Madhukar. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10181, p. 1642–1656, 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30308-3.

GIBSON, Savannah E. R.; HARRISON, James; COX, Jonathan A. G. Modelling a silent epidemic: A review of the in vitro models of latent tuberculosis. **Pathogens**, [S. l.], v. 7, n. 4, 2018. DOI: 10.3390/pathogens7040088.

GHOSH, A. K.; BRINDISI, M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. **J. Med. Chem.**, v. 58, n. 7, p. 2895–2940, 2015

GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021. Geneva: WHO, 2021.<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>. Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

GLOBAL ALLIANCE FOR TB DRUG DEVELOPMENT. Handbook of anti-tuberculosis agents. Introduction. **Tuberculosis**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 85–86, 2008.

GOOSSENS, Sander N.; SAMPSON, Samantha L.; VAN RIE, Annelies. Mechanisms of Drug-Induced Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 1, p. 1–21, 2020. DOI: 10.1128/CMR.00141-20. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00141-20>.

INDRAYANTO, Gunawan; PUTRA, Galih Satrio; SUHUD, Farida. **Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2021. v. 46 DOI: 10.1016/bs.podrm.2020.07.005.

IGNASIAK K.; MAXWELL A. Galleria mellonella (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Res Notes**. 2017 Aug 29;10(1):428. doi: 10.1186/s13104-017-2757-8. PMID: 28851426; PMCID: PMC5576310.

JORJÃO, Adeline L.; OLIVEIRA, Luciane D.; SCORZONI, Liliana; FIGUEIREDO-GODOI, Livia Mara A.; PRATA, Marcia Cristina A.; JORGE, Antonio Olavo C.; JUNQUEIRA, Juliana C.. From moths to caterpillars: ideal conditions for galleria mellonella rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 1 mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871>.

KAVANAGH, Kevin.; FALLON, John. Galleria mellonella larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biology Reviews**. v. 24, n. 1-2, p. 79-83, 2010.

MIYATA M., PAVAN F.R, SATO D. N., MARINO L. B, HIRATA M. H., CARDOSO R. F., MELO F. A. F. de, ZANELLI C. F., QUEICO C., Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic methods, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Volume 65, Issue 6, 2011, Pages 456-459, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.04.021>.

NAHID, Payam et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.63, n. 7, e147-e195, 2016. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw376>.

NOWROUZI, Azin; MEGHRAZI, Khadijeh; GOLMOHAMMADI, Taghi; GOLESTANI, Abolfazl; AHMADIAN, Shahin; SHAFIEZADEH, Mahshid; SHAJARY, Zahra; KHAGHANI, Shahnaz; AMIRI, Azita N. Cytotoxicity of subtoxic AgNP in human hepatoma cell line (HepG2) after long-term exposure. **Iranian biomedical journal**, v. 14, n. 1–2, p. 23–32, 2010. Disponível em: <http://ibj.pasteur.ac.ir>.

O'BRIEN, John; WILSON, Ian; ORTON, Terry; POGNAN, François. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

OECD Guideline for Testing of Chemicals. OECD, 2001. DOI: 10.1787/20745788

ORME, Ian. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, jul. 2001. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.45.7.1943-1946.2001>.

PAI, Madhukar et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16076, 2016. DOI: 10.1038/nrdp.2016.76. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrdp201676>.

PAIVA, Daurita D.. Patologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 5, n. 2, dez. 2006. ISSN 1983-2567. Disponível em: <<https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/9205>>.

PALOMINO, Juan-carlos; MARTIN, Anandi; CAMACHO, Mirtha; GUERRA, Humberto; SWINGS, Jean; PORTAELS, Françoise. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobail Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002. DOI: 10.1128/AAC.46.8.2720.

PARTNERSHIP, Stop Tb. The Stop TB Partnership's Global Drug Facility catalog now lists the first-ever, all-oral regimen for highly resistant forms of drug-resistant tuberculosis at US \$1,040 per treatment course. 2019. Disponível em: http://stoptb.org/news/stories/2019/ns19_025.html. Acesso em: 05 nov. 2021.

PAVAN F. R., MAIA P. I.da S., LEITE S. R. A., DEFLON V. M., BATISTA A. A., SATO D. N., FRANZBLAU S. G., LEITE C.Q.F., Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti – Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity, **European Journal of Medicinal Chemistry**, Volume 45, Issue 5, 2010, Pages 1898-1905, ISSN 0223-5234, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.028>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523410000735>)

RODRIGUEZ-TUDELA, Juan; BARCHIESI, Francesca; BILLE, J. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,(CMI) **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 8, p. 1-8, August 2003. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>.

RUSSELL, David G. Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 252–268, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00984.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2010.00984.x>.

SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Thorax**, v. 37, n. 4, p. 246–251, 1982. DOI: 10.1136/thx.37.4.246. Disponível em: <https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thx.37.4.246>.

SALGAME, Padmini; GEADAS, Carolina; COLLINS, Lauren; JONES-LÓPEZ, Edward; ELLNER, Jerrold J. **Latent tuberculosis infection - Revisiting and revising concepts** Tuberculosis, 2015. DOI: 10.1016/j.tube.2015.04.003.

STANCIL, Stephani L.; MIRZAYEV, Fuad; ABDEL-RAHMAN, Susan M. Profiling pretomanid as a therapeutic option for tb infection: Evidence to date. **Drug Design, Development and Therapy**, [S. l.], v. 15, p. 2815–2830, 2021. DOI: 10.2147/DDDT.S281639.

SUÁREZ, Isabelle; FÜNGER, Sarah Maria; RADEMACHER, Jessica; FÄTKENHEUER, Gerd; KRÖGER, Stefan; RYBNIKER, Jan. **übersichtsarbeit Diagnostik und Therapie der Tuberkulose** *Deutsches Arzteblatt International*, 2019. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0729.

TIBERI, Simon et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases*, [S. l.], v. 18, n. 7, p. e183–e198, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30110-5.

THOMPSON, A. M. et al. Synthesis, Reduction Potentials, and Antitubercular Activity of Ring A/B Analogues of the Bioreductive Drug (6S)-2-Nitro-6-{{4-(trifluoromethoxy)benzyl}oxy}-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824). *J. Med. Chem.*, v. 52, n. 3, p. 637–645, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis.** Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>.