



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
BACHARELADO EM FARMÁCIA

MARIA EUGÊNIA GOUVEIA DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E TOXICIDADE DE
COMPOSTOS ANÁLOGOS A CLOROQUINA E AO ETAMBUTOL**

JOÃO PESSOA – PB

Abril – 2024

MARIA EUGÊNIA GOUVEIA DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E TOXICIDADE DE
COMPOSTOS ANÁLOGOS A CLOROQUINA E AO ETAMBUTOL**

Trabalho de Conclusão de Curso
de graduação apresentado a Coordenação
do Curso de Graduação em Farmácia, do
Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Júnior

Coorientadore: Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araujo

JOÃO PESSOA – PB

Abril - 2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P866a Freitas, Maria Eugênia Gouveia de.
Avaliação do potencial antimicobacteriano e
toxicidade de compostos análogos a cloroquina e ao
etambutol / Maria Eugênia Gouveia de Freitas. - João
Pessoa, 2024.
63 f. : il.

Orientação : Valnês da Silva Rodrigues Júnior.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Cloroquina. 3.
Etambutol. I. Rodrigues Júnior, Valnês da Silva. II.
Título.

UFPB/CCS

CDU 616-002.5

MARIA EUGÊNIA GOUVEIA DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E TOXICIDADE DE
COMPOSTOS ANÁLOGOS A CLOROQUINA E AO ETAMBUTOL**

Trabalho de Conclusão de Curso
de graduação apresentado a Coordenação
do Curso de Graduação em Farmácia, do
Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 26/06/2024

Documento assinado digitalmente
 **VALNÊS DA SILVA RODRIGUES JUNIOR**
Data: 30/06/2024 19:12:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior (Orientador)

Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente
 **ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA**
Data: 01/07/2024 14:02:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa (Examinadora Interna)

Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente
 **FRANCISCO HUMBERTO XAVIER JÚNIOR**
Data: 01/07/2024 16:51:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior (Examinador Interno)

Universidade Federal da Paraíba

*Dedico este trabalho aos meus pais,
amigos e colegas de pesquisa. Vocês
foram fundamentais para realização
desse projeto.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me capacitar. Aos meus pais, Marinete e Geraldo, pelo suporte e por me incentivarem a alcançar meus sonhos. A minha irmã, Maria Eduarda, por sempre torcer por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Júnior, por ter confiado em mim e no meu trabalho, também pela paciência e atenção.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Demétrius Araújo, por ter me oferecido o suporte estrutural para desenvolver esse projeto.

A doutoranda, Maria Gabriella Silva Sidrônio, pela disponibilidade, atenção, auxílio na escrita deste trabalho.

A Bianca Alves pela amizade e companheirismo para realização de cada experimento.

A terapeuta Verônica Sue por sempre me ouvir com atenção.

A Maria Isabela Araújo pela ajuda com os detalhes da escrita deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho e a Dr. Juliana Medeiros por terem me indicado para iniciação científica no LBCM.

Aos colaboradores do LBCM, Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho e ao mestrando Éverton Paz pela parceria.

A toda a equipe do LBCM, a técnica, aos doutorandos, mestrandos e colegas da iniciação científica.

A banca por terem aceitado participar da conclusão desse projeto e pelas considerações.

*“Pra quem tem fé, a vida
nunca tem fim”
(O rappa)*

RESUMO

Mycobacterium tuberculosis é o microrganismo causador da tuberculose, uma doença infecto contagiosa crônica, que se não tratada adequadamente pode levar à morte do indivíduo. A emergência de cepas resistentes de *MTB*, que não respondem aos tratamentos convencionais, representa uma séria preocupação para as autoridades de saúde. Em decorrência disso, se faz necessário o desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas com potencial anti-tuberculoso. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicobacteriana e a toxicidade de cinco compostos análogos simultaneamente a cloroquina e ao etambutol. Para isso, esses análogos foram testados contra *MTB* H37Ra para determinação da sua concentração inibitória mínima, além de ter sua citotoxicidade avaliada nas linhagens celulares Vero E6 e RAW 264.7. Ainda foi avaliada a toxicidade dos análogos a partir da exposição destes a *Artemia salina*. A realização desses ensaios, permitiu concluir que as moléculas DOC-79, DOC-89, DOC-107 e DOC-120 apresentaram atividade antimicobacteriana de 25 µg/mL, enquanto a DOC-76 apresenta a 12,5 µg/mL. As DOCs não comprometeram a viabilidade da linhagem Vero E6, porém houve comprometimento da viabilidade da RAW 264.7 em todas as concentrações testadas. A exposição ao tratamento com as DOCs não comprometeu a sobrevivência da *A. salina* em concentrações correspondentes aos seus MICs. A partir desse experimento a DOC-76 foi o análogo escolhido como molécula líder em decorrência da sua capacidade antimicrobiana e relativa segurança farmacológica. A combinação entre a DOC-76 e rifampicina resultou em atividade aditiva, enquanto as combinações com o etambutol e com o moxifloxacino resultaram em ausência de interação. O potencial inibitório contra *MTB*, seu perfil de segurança farmacológica e a ausência de atividade antagônica contra os fármacos testados sugerem que a DOC-76 pode ser considerada uma candidata promissora para futuros ensaios almejando incorporar novas alternativas para o tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Cloroquina; Etambutol.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is the causative microorganism of tuberculosis, an infectious and contagious chronic disease that, if not adequately treated, can lead to the death of the affected individual. The emergence of resistant strains of MTB, which do not respond to conventional treatments, represents a serious concern for health authorities. As a result, it is necessary to develop new pharmacological alternatives with anti-tuberculous potential. In this sense, the present work aimed to evaluate the antimycobacterial activity and toxicity of five analogous compounds simultaneously to chloroquine and ethambutol. To this end, these analogues were tested against MTB H37Ra to determine their minimum inhibitory concentration, in addition to having their cytotoxicity evaluated in Vero E6 and RAW 264.7 cell lines. The toxicity of the analogues was also evaluated based on their exposure to *Artemia salina*. Carrying out these tests allowed us to conclude that the DOC-79, DOC-89, DOC-107 and DOC-120 molecules showed antimycobacterial activity of 25 µg/mL, while DOC-76 showed 12.5 µg/mL. The DOCs did not compromise the viability of the Vero E6 strain, but the viability of RAW 264.7 was compromised at all concentrations tested. Exposure to treatment with DOCs did not compromise the survival of *A. salina* at concentrations corresponding to their MICs. From this experiment, DOC-76 was the analogue chosen as the lead molecule due to its antimicrobial capacity and relative pharmacological safety. The combination between DOC-76 and rifampicin resulted in additive activity, while the combinations with ethambutol and moxifloxacin resulted in no interaction. The inhibitory potential against MTB, its pharmacological safety profile and the absence of antagonistic activity against the drugs tested suggest that DOC-76 can be considered a promising candidate for future trials aiming to incorporate new alternatives for the treatment of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Chloroquine; Ethambutol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
Figura 3. Taxa de incidência mundial de tuberculose em 2022.....	19
Figura 4. Número estimado da incidência de casos de tuberculose em 2022, para países com pelo menos 100000 casos da doença.....	20
Figura 5. Tendência global em notificações de casos de pessoas recém diagnosticadas com tuberculose, 2010–2022.	21
Figura 6. Coeficiente de incidência de tuberculose (casos por 100 mil habitantes) por UF.	21
Figura 7. Coeficiente de incidência (casos por 100 mil habitantes) e número de casos novos de tuberculose.	23
Figura 8. Esquema polimedicamentoso para tratamento da tuberculose.....	24
Figura 9. Mecanismo de ação dos principais medicamentos.....	25
Figura 10. Estrutura do etambutol e da cloroquina.....	28
Figura 11. Estrutura da série de análogos ao etambutol e a cloroquina.....	29
Figura 12. Origem estrutural da série de análogos ao etambutol e a cloroquina....	399
Figura 13. Viabilidade da linhagem celular Vero E6 após 72 h de incubação com DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120, cloroquina e etambutol.....	411
Figura 14. Viabilidade da linhagem RAW 264.7 frente a DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120 após 72h de tratamento. * e ** correspondem a $P<0,05$ e a $P<0,01$, respectivamente.....	444
Figura 15. Sobrevivência da <i>Artemia salina</i> frente a DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120, cloroquina e etambutol após 24h de tratamento. * e *** indicam que $P<0,05$ e $P<0,001$, respectivamente.	477
Figura 16. Ensaio de combinação entre DOC-76 e rifampicina (lado esquerdo) e DOC-76 e moxifloxacino (lado direito) contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra.....	50
Figura 17. Ensaio de combinação entre DOC-76 e rifampicina (lado esquerdo) e DOC-76 e moxifloxacino (lado direito) contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra.....	511
Figura 18. Ensaio de combinação entre DOC-76 e etambutol contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos fármacos anti-TB usados como controles positivos do ensaio com a cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra.	36
Tabela 2. Concentrações inibitórias mínimas (MICs) do etambutol, da cloroquina e de seus análogos contra cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra.	37
Tabela 3. Viabilidade (% $\pm$ SD) da DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107 e DOC-120 frente a RAW 264.7 em 72h de tratamento, na concentração inibitória mínima.....	45
Tabela 4. Combinações entre o derivado da cloroquina e etambutol de maior potência, DOC-76, e os fármacos anti-TB rifampicina, moxifloxacino e etambutol.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Micromolar
CQ	Cloroquina
ETB	Etambutol
FICI	Índice de concentração inibitória fracionada
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
INH	Isoniazida
MIC	Concentração inibitória mínima
mL	Mililitros
MOX	Moxifloxacino
MDR-TB	Tuberculose resistente a múltiplos fármacos
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OD	Densidade óptica
REMA	Ensaio de microplaca com resazurina
RDR-TB	Tuberculose resistente a múltiplos fármacos
RIF	Rifampicina
TB	Tuberculose
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente a fármacos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	ASPECTOS GERAIS DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
2.2	EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO MUNDO	18
2.3	EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO BRASIL.....	21
2.4	TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	23
2.5	DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-TB.....	26
2.6	NOVOS COMPOSTOS ANÁLOGOS A CLOROQUINA E AO ETAMBUTOL ...	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> H37RA	31
4.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	31
4.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE ARTEMIA SALINA LEACH.....	32
4.4	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ATIVIDADE COMBINADA ENTRE OS ANÁLOGOS E FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS.....	33
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM <i>M.</i> <i>Tuberculosis</i> H37RA.....	36
5.2	INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	40
5.2.1	<i>Avaliação da citotoxicidade com Vero E6</i>	40
5.2.2	<i>Avaliação da citotoxicidade com RAW 264.7</i>	43
5.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE ARTEMIA SALINA LEACH.....	45

5.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ATIVIDADE COMBINADA ENTRE A MOLÉCULA DOC-76 E FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS	48
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), tendo como característica se abrigar nos pulmões dos indivíduos que entram em contato com este microorganismo (Pai *et al.*, 2016). A TB pode ser transmitida por via aérea, quando um indivíduo contaminado tosse, espirra ou fala, expelindo o agente infeccioso (Massabni; Bonini, 2019). Os sintomas clássicos causados pela infecção incluem febre, dispneia, fadiga, perda de apetite, tosse persistente e hemoptose (expectoração de sangue) (Natarajan *et al.*, 2020).

Apesar de remontar a eras anteriores a Cristo, a TB ainda exerce um impacto significativo na mortalidade (Hershkovitz *et al.*, 2015). Ao ser infectado, o paciente pode desenvolver dois estágios de infecção aTB latente e a ativa; o indivíduo com TB latente não apresenta sintomas nem transmite a doença, enquanto na sua forma ativa o indivíduo apresenta sintomas e é capaz de transmitir a doença (Rahlwes *et al.*, 2023).

A infecção por MTB, se dá através da inalação de um pequeno número de bactérias, que alcançam o trato respiratório inferior (Pai *et al.*, 2016), infectando principalmente macrófagos alveolares e outros tipos celulares como monócitos e células dendríticas; após ser fagocitado o MTB executa vários mecanismos que o protegem da resposta imune do hospedeiro (Chandra; Grigsby; Philips, 2022).

Em decorrência da capacidade do MTB continuar persistente após a resposta imune do hospedeiro, se faz necessário que indivíduos contaminados com a TB ativa adotem um esquema poliquimioterápico, a fim de trazer a morte bacilar e a cura desses indivíduos (Dartois; Rubin, 2022). Todavia, o MTB pode apresentar condições adaptativas na sua infecção, que compromete a eficiência dos fármacos disponíveis para o tratamento da TB (Reid *et al.*, 2019).

A presença de bacilos de MTB resistentes, pode estar associado a limitações na adesão ao esquema poliquimioterápico, fatores como longa duração do tratamento, altas dosagens, e o esquema polimedicamentoso associado a diversos efeitos colaterais, influenciam diretamente nos altos índices de TB resistente (Khawbung; Nath; Chakraborty, 2021).

Na busca de novos fármacos eficientes contra TB resistente, pesquisas que buscam desenvolver novas metodologias para o tratamento da TB vem ganhando bastante enfoque nos últimos anos, metodologias que se baseiam no

reposicionamento de fármacos (Sidrônio *et al.*, 2021), bem como na síntese de análogos a partir de fármacos comercializados no mercado (Linhares *et al.*, 2023), se mostram como estratégias promissoras para erradicar a TB resistente. Nessa perspectiva o desenvolvimento de estudos que buscam novos fármacos eficientes para a terapia da TB se fazem extremamente necessários.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil antimicobacteriano e a toxicidade de um grupo de moléculas análogas simultaneamente ao etambutol, fármaco integrante do esquema de tratamento da tuberculose, e à cloroquina, um antimalárico candidato ao reposicionamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DO *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium*, pertencente à família *Mycobacteriaceae*, conta com mais de 120 espécies, sete delas têm grande importância humana e veterinária, como a *M. canneti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* (Smith *et al.*, 2009; Massabni; Bonini, 2019). Esta última representa um antigo patógeno humano que sucedeu ao longo dos anos, acompanhando a espécie humana em sua evolução, por conta de sua adaptação tanto a condições do ambiente quanto às defesas do hospedeiro (Hershkovitz *et al.*, 2015; Barbier; Wirth, 2016).

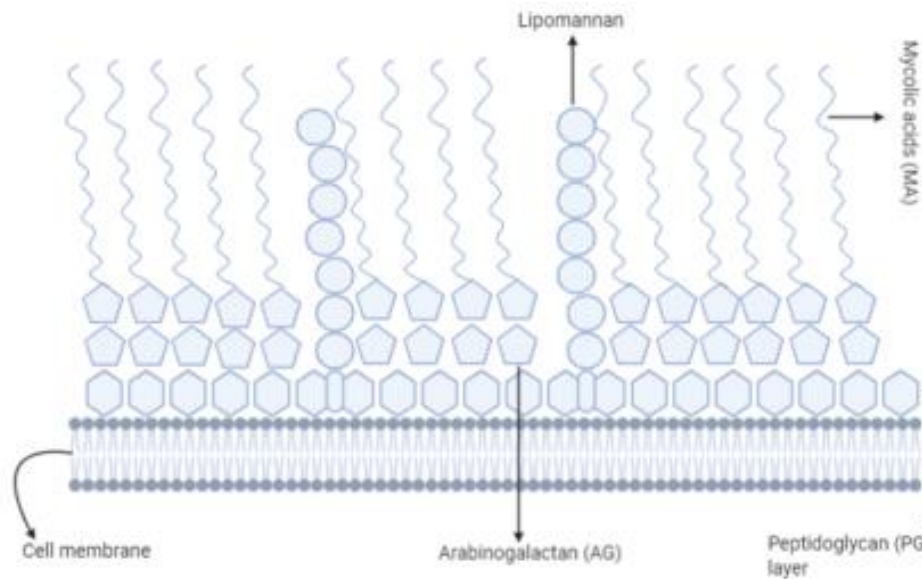
O bacilo MTB, também conhecido como bacilo de Koch, foi descoberto em 1882 pelo médico alemão Robert Koch, desde então é reconhecido como agente causador da TB (Cambau; Drancourt, 2014). A parede celular do MTB diferencia esse patógeno de outros microorganismos causadores de doença (Brennan, 2003).

O ácido micólico (AM) é um componente exclusivo do gênero *Mycobacterium spp.* que contribui para o sucesso da infecção da TB, suas unidades estão dispostas sobre a parede celular formando uma camada protetora, que confere a parede celular baixa permeabilidade e resistência a água, além de proteção contra a maioria dos antibióticos (Figura 1) (Queiroz; Riley, 2017).

No curso de sua evolução, o MTB se tornou capaz de sobreviver em baixa atividade metabólica, em condições de privação nutricional e em anaerobiose (Bets *et al.*, 2002). Essas adaptações são imprescindíveis para que o bacilo persista aos mecanismos de defesa da célula infectada (Manabe, 2000).

Para sobrevivência no interior do macrófago, o MTB usa ácidos graxos e colesterol do próprio hospedeiro como fonte de carbono, converte esses lipídeos em produtos que regulam a sua replicação, virulência e tolerância a drogas (Wilburn; Fieweger; VanderVen, 2018). Este é um mecanismo considerado raro, somente alguns organismos gram-negativos e *Actinomyces* são conhecidos por apresentarem essa característica (Wilburn; Fieweger; VanderVen, 2018).

Figura 1. Representação da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*



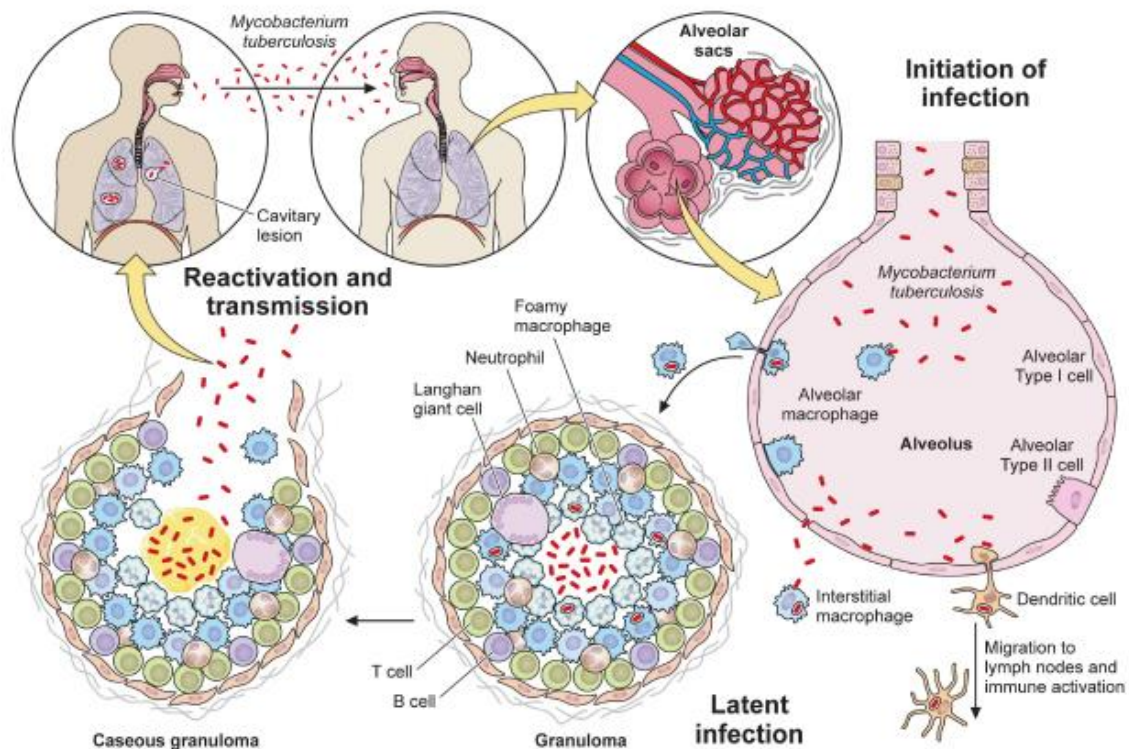
Fonte: (Sachan *et al.*, 2023)

Ao entrar em contato com o MTB, o macrófago realiza a fagocitose, englobando a bactéria em seu interior e formando uma vesícula denominada fagossomo; essa vesícula, posteriormente, se funde com o lisossomo, possibilitando a degradação enzimática eficaz do bacilo (Rahlwes *et al.*, 2023).

No entanto, o MTB tem a capacidade de interferir nesse processo, seus fatores de virulência provocam o rompimento da membrana dos fagossomos, tornando a fusão do fagossomo com lisossomo mal sucedida (Martino *et al.*, 2019), o que impede a sua degradação e permite seu acesso ao citosol e a nutrientes em abundância (Bao *et al.*, 2023). Outro mecanismo de persistência no interior do macrófago é a neutralização do pH do fagossomo e a resistência a acidificação (Chandra; Grigsby; Philips, 2022).

Ao escapar dos mecanismos de defesa do macrófago, o MTB se instala no parênquima pulmonar, e em decorrência disso há formação de um granuloma (tubérculo), uma resposta multicelular à infecção, que é uma forma do hospedeiro impedir que patógeno infecte outros sistemas (Sia; Rengarajan, 2019).

Figura 2. Ciclo de vida do *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: Rawlhes et al., 2023

O granuloma contém a infecção com MTB, permitindo que a doença permaneça em estado latente às vezes por anos (Cohen; Gern; Urdahl, 2022). O granuloma funciona efetivamente como um abrigo para o bacilo, permitindo sua sobrevivência latente no organismo (Martino *et al.*, 2019). Essa capacidade de se manter confinado no granuloma, sem conseguir ultrapassar sua camada fibrosa, é um dos motivos pelos quais muitos indivíduos não desenvolvem TB ativa (Martino *et al.*, 2019).

Alguns indivíduos por fatores diversos, como co-infecção por outros patógenos como o HIV (Sultana *et al.*, 2021), imunodepressão (Gartini *et al.*, 2022) estado nutricional precário (Carvalho *et al.*, 2018), não conseguem combater a infecção através da formação do tubérculo. Nesses casos o MTB se prolifera e atinge o sistema linfático e circulação sistêmica chegando a acometer outros órgãos como rins, pele, sistema gastro-intestinal e nervoso (Adigun; Signh, 2023).

A disseminação da TB mundialmente é consequência da sua competência como patógeno, e a prova de sua ocorrência mais antiga é datada a 4.400 anos atrás em múmias egípcias, mas há relatos de sua existência em antigos documentos indianos escritos há 3.300 anos e em documentos chineses escritos a 2.300 anos

(Barberis *et al.*, 2017).

Por um período da história da humanidade não se tinha conhecimento a respeito do agente etiológico da TB, nem sobre a sua forma de transmissão, e todas as formas de tratamento feitas antes da descoberta de Koch eram empíricas (Tyagi; Dhar, 2003) e até holísticas (Peng; Lu, 2021); ainda, alguns povos atribuíam causas místicas para o desenvolvimento da doença (Ts'un-Yan, 1971).

A descoberta de Koch ocorreu em um momento onde a TB impactava significativamente a população mundial (Daniel, 2006). A revolução industrial e as condições sanitárias da época, proporcionaram ao bacilo um cenário favorável para disseminação (Loddenkemper; Murray, 2021). Estima-se que 15 a 30% dos adultos que habitavam Londres nesse período foram infectados com MTB (Murray; Schraufnagel; Hopewell, 2015).

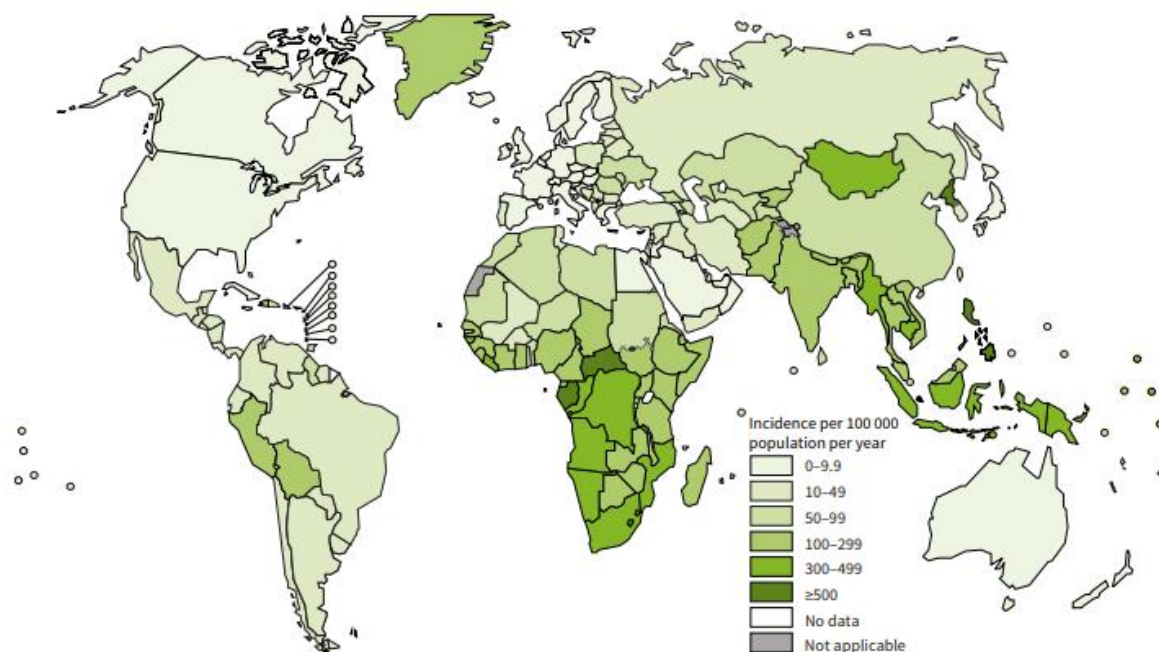
Atualmente, estima-se que 10% da população infectada por MTB desenvolve a doença em seu estágio ativo (Salgame *et al.*, 2015), e cerca de 10 milhões de pessoas a cada ano são acometidas por ela desde 2000 (Alsayed; Gunosewoyo, 2023). Diante disso, a continuidade do desenvolvimento de estudos é imprescindível para promover avanços ao combate da doença que assombra a humanidade há séculos.

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO MUNDO

A TB pode afetar qualquer indivíduo, independentemente de gênero ou idade (Horton *et al.*, 2020). No entanto, foi observado no relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2022, uma distribuição desigual no número de casos da TB, com maior incidência em homens adultos, acometendo 55% da população mundial infectada, seguidos por mulheres adultas, com uma taxa de infecção de 33% (WHO, 2023).

Na Figura 3, observamos que a incidência da TB pelo mundo não é uniforme e está sujeita a variações (Fukunaga *et al.*, 2021). A atual farmacoterapia direcionada para o combate do MTB, revela que a incidência da TB não pode ser atribuída apenas a eficiência dos fármacos contra ela, pois ela também está intrinsecamente ligada a fatores socioeconômicos (Schoeman; Westaway; Neethlingt, 1991).

Figura 3. Taxa de incidência mundial de tuberculose em 2022.



Fonte: WHO, 2023

Esses fatores incluem condições de vida (Hudelson, 1996), acesso a cuidados de saúde (Marahatta *et al.*, 2020), pobreza (Oxlade; Murray, 2012) e outros determinantes sociais como condições da moradia e hábitos de vida, que influenciam na propagação e a prevalência da TB em diferentes regiões e populações (Lönnroth *et al.*, 2009).

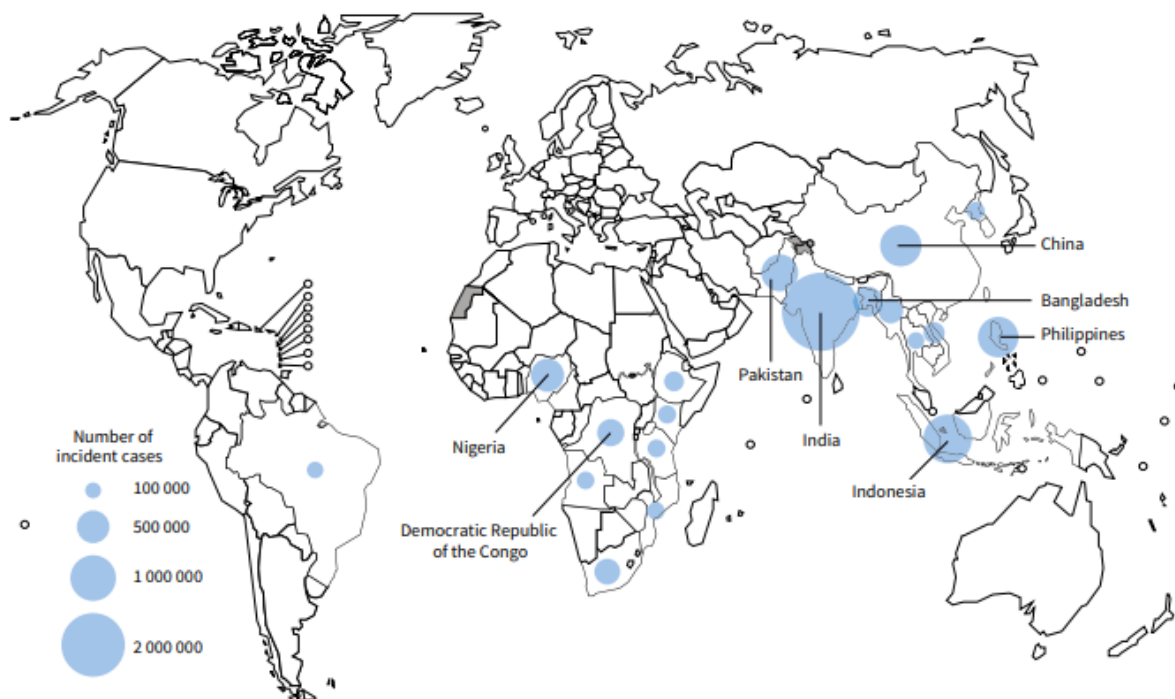
A compreensão mais ampla dos determinantes sociais da TB é fundamental para desenvolver estratégias eficazes para prevenção, diagnóstico e tratamento da doença em nível global (Schoeman; Westaway; Neethlingt, 1991).

Segundo a OMS (2023), as regiões onde houve maior incidência de TB foram no sudoeste da Ásia (46%), África (23%) e na região do Pacífico Ocidental (18%). Os países onde há maior incidência mundial são Índia (27%), Indonésia (10%), China (7,1%), Filipinas (7,0%), Paquistão (5,7%), Nigéria (4,5%), Bangladesh (3,6%) e República democrática do Congo (3,0%), (Figura 4) (WHO, 2023).

Ao observar prevalência de TB majoritariamente em países subdesenvolvidos, observa-se que incidência da doença está diretamente relacionada a pobreza e baixo Índice de Desenvolvimento Humano, (Figura 5) (Carter *et al.*, 2018). A estimativa mundial de indivíduos diagnosticados com TB no ano de 2022 foi de 10,6 milhões de pessoas (WHO, 2023), enquanto no ano de 2019, ano antecedente a pandemia da Covid-19, a estimativa mundial de indivíduos infectados por TB foi de 10 milhões

(WHO, 2020).

Figura 4. Número estimado da incidência de casos de tuberculose em 2022, para países com pelo menos 100000 casos da doença.



Fonte: WHO, 2023

Em anos anteriores a pandemia da Covid-19, dados divulgados pela OMS indicavam uma tendência decrescente na taxa de novos casos de TB (Figura 5) (WHO, 2023). Em decorrência disso, nota-se que a pandemia da Covid-19 impactou a incidência global de TB, contribuindo para o aumento do número de casos da doença.

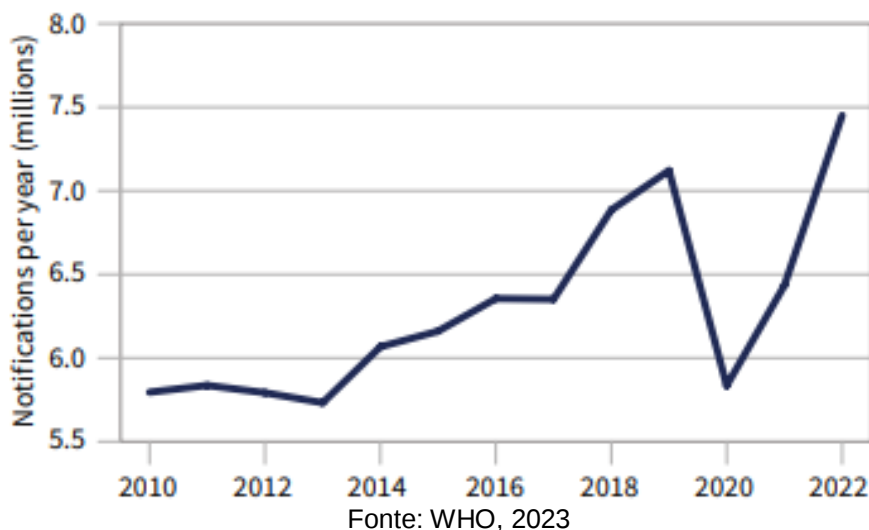
Durante o período pandêmico, os serviços de saúde em escala mundial foram sobrecarregados (Tuczyńska; Matthews-Kozanecka; Baum, 2021). Os recursos e atenção à saúde destinados para o enfrentamento da Covid-19, culminaram na interrupção das atividades de rastreamento de novos casos de infecção por MTB, e na descontinuidade do tratamento de pacientes diagnosticados com TB (Silva et al., 2021). Resultando na disseminação da doença e no diagnóstico tardio de pacientes já infectados (Pai et al., 2022).

Segundo a OMS, no ano de 2021 a incidência de pessoas co-infectadas com HIV e TB foi de 6,7% (WHO, 2022). O região que apresentou maior número de indivíduos recém diagnosticados com TB foi o continente africano (WHO, 2022).

A co-infecção entre TB e HIV é preocupante, pois o HIV induz a evolução do quadro de TB, assim a TB sai do estágio latente para o ativo (Sultana et al., 2021).

Além de induzir a evolução da Tuberculose, o HIV também pode estimular o MTB a ser resistente a drogas antituberculosas (Singh *et al.*, 2020; Sultana *et al.*, 2021).

Figura 5. Tendência global em notificações de casos de pessoas recém diagnosticadas com Tuberculose, 2010–2022.



2.3 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO BRASIL

Estima-se que no ano de 2022, houve 36,3 novos casos de TB para cada 100 mil habitantes no Brasil, (Figura 7) (Brasil, 2023). Naquele ano, foi notificado que as Unidades Federais (UF) onde a população tinha maior risco de adoecer por TB foram Amazonas, com 84,1 casos por 100 mil habitantes, Roraima, com 75,9 casos por 100 mil habitantes, seguido de Rio de Janeiro, com 68,6 casos por 100 mil habitantes (Figura 6) (Brasil, 2023) .

Dados apontados pelo Boletim Epidemiológico de 2023, indicam que o número de óbitos vinha decrescendo gradualmente ano após ano. Até que em 2021, houve aumento do número de óbitos por TB, quebrando a tendência que estava se repetindo há aproximadamente duas décadas (Figura 7) (Brasil, 2023).

Assim como foi relatado mundialmente, no Brasil a pandemia de Covid-19 no ano de 2020 causou transtorno no monitoramento e na notificação de novos casos de TB, pois ela afetou diretamente o diagnóstico e tratamento das pessoas infectadas por MTB (Silva *et al.*, 2021). No contexto da pandemia, o sistema de saúde brasileiro enfrentou uma redução na oferta de serviços (Maia *et al.*, 2022).

Figura 6. Coeficiente de incidência de tuberculose (casos por 100 mil habitantes) por UF.



Fonte: Brasil, 2023

Além disso, outros fatores, como restrições na circulação de pessoas e a diminuição da procura por atendimento médico, contribuíram para o aumento nas taxas de infecção e óbito por TB quando comparadas aos anos anteriores à pandemia (Brasil, 2023). A semelhança entre os sintomas da Covid-19 e da TB também desempenhou um papel significativo nesse cenário (Brasil, 2023).

O boletim epidemiológico emitido em 2022 pela Secretária da Saúde da Paraíba, revela que no ano de 2020 houve aumento de 9,5% do abandono do tratamento de TB entre as pessoas infectadas por TB em todo o estado (Secretaria de Saúde da Paraíba, 2022).

Já no ano seguinte, 2021, houve elevação no número de casos de óbito causado por TB na Paraíba (Secretaria de Saúde da Paraíba, 2022). Esses dados apontam que, assim como ocorreu em todas as outras UF's do Brasil, as atividades de vigilância da TB pelos serviços de saúde municipais da Paraíba foram impactados pela Covid-19.

Figura 7. Coeficiente de incidência (casos por 100 mil habitantes) e número de casos novos de tuberculose.



Fonte: Brasil, 2023

2.4 TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

O tratamento para combater a TB é realizado por meio de um esquema polimedicamentoso (Sotgiu *et al.*, 2015). Os medicamentos utilizados são divididos em dois grupos: os medicamentos de primeira linha e os medicamentos de segunda linha de tratamento (Ahuja *et al.*, 2012).

Os fármacos de primeira e segunda linha diferem quanto ao grau de toxicidade e efetividade (Prasad; Singh; Gupta, 2021), dessa forma os fármacos de primeira linha são a primeira escolha para iniciar o tratamento da TB, e os fármacos de segunda linha são associados a terapia em caso de resistência da MTB aos fármacos de primeira linha (Ramachandran; Swaminathan, 2015).

A OMS, preconiza que a terapia para TB deve ter duração de cerca de seis meses de tratamento com 4 fármacos de primeira linha, sendo elas a rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etambutol (ETB) e piraminazida (PZA) (WHO, 2023) (Figura 8). O uso concomitante desses 4 fármacos deve durar 2 meses, e essa etapa do tratamento corresponde a fase intensiva; os 4 meses restantes de tratamento correspondem à fase de manutenção, onde o paciente faz uso de apenas dois medicamentos, a RIF e a INH (WHO, 2022).

Para produzir efeito inibitório contra a MTB, cada medicamento, seja de

segunda ou primeira linha de tratamento, apresenta um mecanismo de ação diferente. Dentre os fármacos de primeira linha, a RIF é capaz de inibir a transcrição gênica, bloqueando a síntese de RNA (Hoagland *et al.*, 2016).

Figura 8. Esquema polimedicamentoso para tratamento da tuberculose

Esquema	Fármacos	Peso	Dose	Meses
RINHPE Fase intensiva	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Etambutol	Até 20kg	R: 10mg/kg/dia INH: 10mg/kg/dia P: 35mg/kg/dia E: 25mg/kg/dia	2
		20-35kg	2 comprimidos	
		36-50kg	3 comprimidos	
		>50kg	4 comprimidos	
RINH Fase de manutenção	Rifampicina Isoniazida	Até 20kg	R: 10mg/kg/dia INH: 10mg/kg/dia	4
		20-35kg	2 comprimidos	
		36-50kg	3 comprimidos	
		>50kg	4 comprimidos	

Fonte: (Conde *et al.*, 2009)

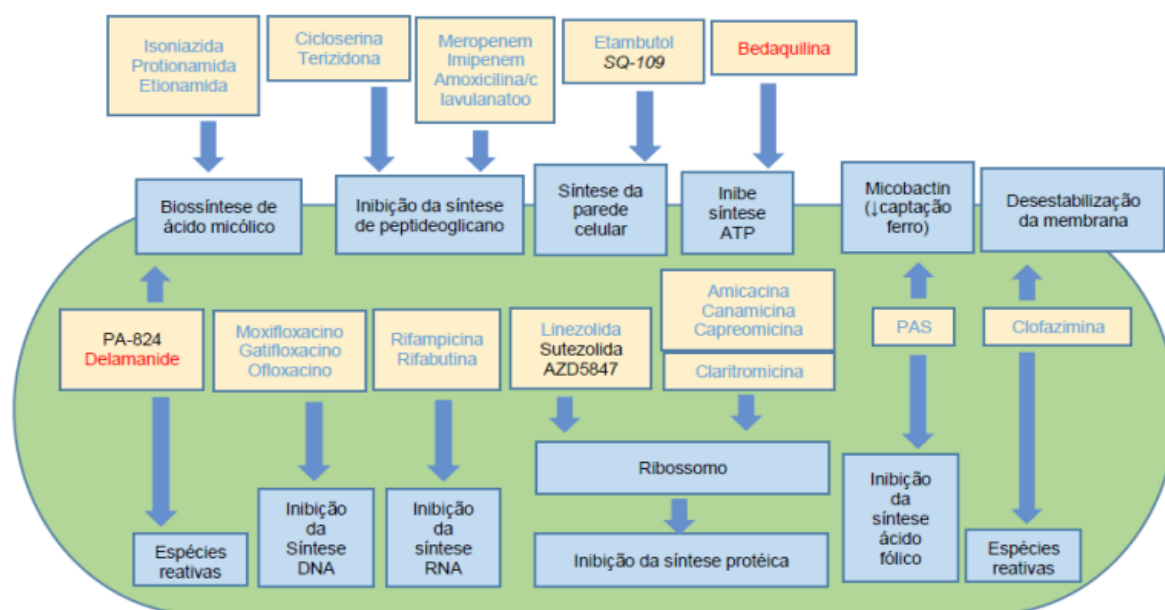
A INH é capaz de inibir a biosíntese de ácidos micólicos, além de causar danos ao DNA do MTB (Unissa *et al.*, 2016). A ação da PZA envolve a inibição da tradução, enquanto o ETB atua inibindo a síntese de arabinogalactana, que é um componente da parede celular do MTB (Hoagland *et al.*, 2016) (Figura 9).

A segunda linha de tratamento anti-TB consiste na terapia com estreptomicina, da classe dos aminoglicosídeos, moxifloxacino, da classe das fluoroquinolonas, clofazamina, linezolida, etionamida e protionamida. Esses fármacos podem ser usados combinados com os fármacos de primeira linha ou podem ser combinados entre si (Imran *et al.*, 2022). Diferente do tratamento com os fármacos de primeira linha, o tratamento com os fármacos de segunda linha é muito mais extenso e custoso (Imran *et al.*, 2022).

A taxa de morte por TB em pacientes não tratados é de 50% (WHO, 2023). Portanto, a terapia polimedicamentosa é imprescindível para o combate da doença. Estima-se que aproximadamente 85% dos indivíduos infectados com a TB, que concluem os seis meses de tratamento com fármacos antituberculosos, alcançam a

cura da infecção ao término desse período (WHO,2023).

Figura 9. Mecanismo de ação dos principais medicamentos.



Fonte: (Massabni; Bonini, 2019)

No Brasil, cerca 66,5% dos pacientes em tratamento com medicamentos anti-TB foram considerados curados da TB ao término do tratamento (Brasil, 2023), indicando que maiores esforços ou novas estratégias devem ser empregadas ao combate desta doença no país.

Nem todas as pessoas infectadas por MTB que iniciam o tratamento conseguem alcançar a cura da TB ao final da terapia (WHO, 2022). Diversos fatores podem contribuir para isso, incluindo a resistência do patógeno aos fármacos de primeira linha de tratamento (Degiacomi *et al.*, 2022), a adesão adequada à terapia por parte do paciente, que envolve respeitar os horários das doses e fazer uso das quatro fármacos do esquema anti-TB, e até mesmo o abandono do tratamento pelo indivíduo infectado (Massabni; Bonini, 2019; Nezenega; Perimal-lewis; Maeder, 2020).

O MTB pode desenvolver tolerância e perda da sensibilidade aos antibióticos, essa tolerância pode ser observada predominantemente contra os fármacos da primeira linha de tratamento (Johnson *et al.*, 2009). A tolerância permite que o MTB persista mesmo após exposição prolongada às drogas anti-TB (Sachan *et al.*, 2023).

A disseminação da infecção por cepas de MTB resistentes à rifampicina (RDR-TB), resistentes a múltiplos fármacos (MDR-TB) e extensivamente resistentes a fármacos (XDR-TB), é uma das razões pelas quais os pacientes infectados por essas

cepas de MTB enfrentam uma batalha prolongada contra a TB (Khosravi *et al.*, 2019).

Essas cepas de MTB resistentes representam um desafio significativo no tratamento da TB, exigindo terapias mais complexas e prolongadas, o que pode resultar em taxas de cura mais baixas e maiores índices de falha no tratamento, assim como maiores efeitos colaterais nos pacientes (Imran *et al.*, 2022; WHO, 2023).

A adesão inadequada à poliquimioterapia anti-TB por parte do indivíduo infectado por TB, ou o abandono da poliquimioterapia, podem induzir o desenvolvimento de resistência em cepas de MTB sensíveis a drogas (Ila *et al.*, 2010). A mutação da MTB também é um mecanismo responsável pela resistência do MTB a múltiplos fármacos (Singh; Chibale, 2021).

Estima-se que no ano de 2022, 4,4% da população mundial infectada por MTB apresenta infecção por uma cepa resistente (RDR-TB, MDR-TB ou XDR-TB) (WHO, 2023). No Brasil, em 2022, foram detectados 1.104 novos casos de TB, entre os anos de 2015 a 2021 tinham sido detectados 6.834. A proporção de cepas RDR-TB detectadas em 2022 foi elevada em relação ao número de casos detectados entre 2015 e 2021, que corresponde a um intervalo de 7 anos (Brasil, 2023).

2.5 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-TB

Diante do aumento da incidência mundial de cepas de MTB resistentes, faz-se necessário estudos para investigação e descoberta de novos fármacos com potencial anti-TB (WHO, 2022). Características como neutralizar resistência cruzada do MTB, ter propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas otimizadas, ser um potente bactericida para reduzir a duração da terapia, não antagonizar outras drogas anti-TB, baixo custo, estabilidade, e alta tolerância são parte dos requisitos desejáveis para candidatos a novos fármacos anti-TB (Sachan *et al.*, 2023).

Um ponto importante no desenvolvimento de novos medicamentos anti-TB é a toxicidade e efeitos adversos relacionados a ela (Baghaei *et al.*, 2011). O uso prolongado dos fármacos da primeira linha de tratamento (RIF, INH, ETB e PZA), causa efeitos colaterais, como tontura, rash cutâneo e problemas gastrointestinais (Ejalonibu *et al.*, 2021). Já os fármacos da segunda linha de tratamento são ainda mais tóxicos, menos eficazes, e mais caros que o de primeira linha (Singh; Chibale, 2021). Espera-se que as inovações da terapia contra TB atenuem os efeitos tóxicos e sejam mais eficazes.

A estratégia do reposicionamento de fármacos, pode ser uma aliada na busca de novos tratamentos para TB resistente aos fármacos de primeira e segunda linha de tratamento contra a TB (Maitra *et al.*, 2015). Esse tipo de estudo tem sido bastante explorado para o tratamento da TB (Maitra *et al.*, 2016; Ezquerro-Aznárez *et al.*, 2022).

O reposicionamento de fármacos pode apresentar vantagens significativas, se destacando a possibilidade de utilizar alternativas terapêuticas já estabelecidas para outras enfermidades (An *et al.*, 2020), como o uso de fármacos antimaláricos (Matt *et al.*, 2017). Estes medicamentos, por já terem sido investigados em estudos clínicos para suas indicações originais, possuem sua segurança e eficácia amplamente reconhecidas (Sachan *et al.*, 2023).

Além disso, o reposicionamento de fármacos já comercializados representam um investimento relativamente reduzido, uma vez que a condução de estudos clínicos é uma empreitada dispendiosa para a indústria farmacêutica (Sachan *et al.*, 2023).

2.6 NOVOS COMPOSTOS ANÁLOGOS A CLOROQUINA E AO ETAMBUTOL

A síntese de novas drogas, assim como o reposicionamento de fármacos é uma estratégia importante para o desenvolvimento de novas terapias anti-TB (Degiacomi *et al.*, 2022). A classe de fármacos antimaláricos, tem sido objeto de interesse para o reposicionamento direcionado ao tratamento da TB (Lougheed *et al.*, 2009, Bermudez; Meek, 2014). Alguns estudos relatam a atividade de antimaláricos contra TB, como a tafenoquina, a mefloquina (Sidrônio *et al.*, 2021) e a ferroquina (Mahajan *et al.*, 2011, Sambandamurthy *et al.*, 2006).

A cloroquina (CQ) é um fármaco antimalárico, que há muito tempo tem seu potencial antimalárico reconhecido (Baruah *et al.*, 2018). Além de apresentar efeitos antimaláricos, estudos apontam que a CQ é uma possível candidata a agente anti-TB, pois ao avaliar seu uso em combinação com pirazinamida e INH foi observado que a CQ foi capaz de potencializar a atividade anti-TB desses dois fármacos (Matt *et al.*, 2017). A CQ se mostra interessante por potencializar a atividade das terapias atuais contra MTB, podendo até reduzir o tempo de tratamento da TB (An *et al.*, 2020).

Estudos que exploram a investigação de novos fármacos análogos a medicamentos já existentes no mercado têm recebido crescente atenção (Noschka *et al.*, 2021; Popovici *et al.*, 2021). O SQ109, é um potencial fármaco anti-TB análogo ao

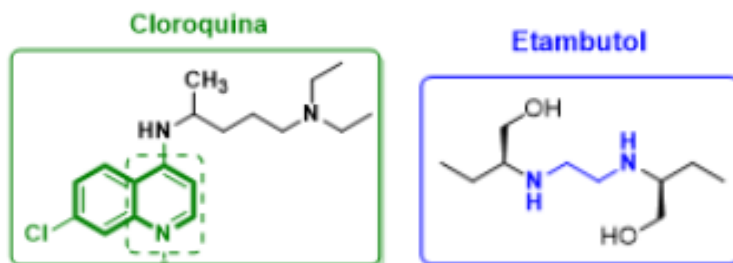
ETB; atualmente ele se encontra em fase de estudos clínicos para ser incorporado como uma opção terapêutica anti-TB (Imran *et al.*, 2022).

O SQ109 se destaca por reduzir o tempo de tratamento da TB de 25% a 30% *in vivo*, além de apresentar efeito sinérgicos quando associado aos fármacos de primeira linha como INH, RIF, e aos fármacos de segunda linha como bedaquilina e clofazimina (Imran *et al.*, 2022).

Diante disso, o desenvolvimento de análogos de fármacos antimaláricos e de análogos de drogas anti-TB, como o ETB, tem se mostrado uma alternativa promissora para encontrar novas formas de tratamento contra TB e contra cepas de MTB resistentes (Rodrigues-Junior *et al.*, 2016; Linhares *et al.*, 2023).

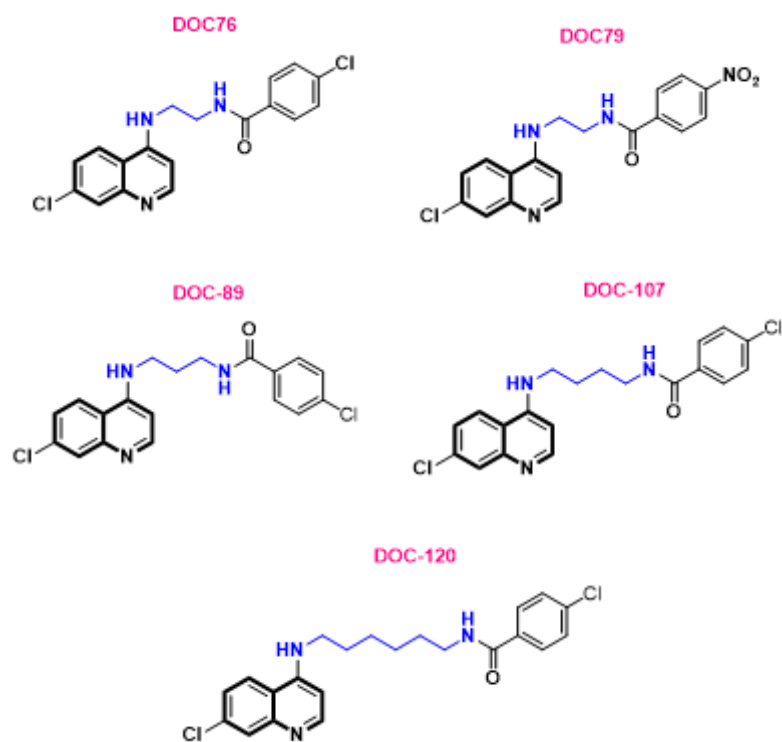
Nesse contexto, o presente estudo propôs avaliar o potencial antimicobacteriano e a toxicidade de cinco compostos análogos a CQ e ao ETB (Figura 10), planejadas, sintetizadas e cedidas por colaboradores do Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Figura 10. Estrutura do etambutol e cloroquina



Fonte: Ilustração cedida pelos colaboradores do LPBS, 2023

Figura 11. Estrutura da série de análogos ao Etambutol e a Cloroquina.



Fonte: Ilustração cedida pelos colaboradores do LPBS, 2023

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a capacidade antimicobacteriana e a toxicidade de novos compostos análogos ao etambutol e a cloroquina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) destes análogos frente a cepas de *M. tuberculosis* H37Ra;
- Avaliar a citotoxicidade dos análogos na linhagem de células renais de Macaco do Velho Mundo, Vero E6;
- Avaliar a citotoxicidade dos análogos na linhagem de macrófagos murinos, RAW 264.7;
- Avaliar a toxicidade dos compostos bioativos em náuplios de *Artemia salina*;
- Investigar o efeito da atividade combinada entre os análogos e fármacos antimicobacterianas.

4 METODOLOGIA

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM *Mycobacterium Tuberculosis* H37RA

Para determinar da Concentração Inibitória Mínima (MIC), a suspensão de MTB foi cultivada a 37°C em meio Middlebrook 7H9, com adição de 0,05% de tween 80, e 0,01% de glicerol, suplementada com 10% de OADC (ácido oleico, destrose, catalase e cloreto de sódio).

No procedimento, as moléculas foram solubilizadas em DMSO e dispostas em uma placa de 96 poços fundo em U, atingindo a concentração máxima de 200 µg/mL no primeiro poço. A partir do primeiro poço, realizou-se uma diluição seriada até alcançar a concentração mínima de 1,5 µg/mL. Os fármacos de controle, moxifloxacino (MOX) e RIF, ambos provenientes da Sigma-Aldrich, foram igualmente solubilizados em DMSO, atingindo concentrações máximas de 0,72 µg/mL e 0,2 µg/mL, respectivamente. Assim como as demais drogas, o MOX e a RIF foram diluídos em série (7x). A concentração final de DMSO no experimento se manteve a 2,5%.

A densidade óptica da suspensão (λ 595nm) foi ajustada para 0,006 com o auxílio de um espectrofotômetro, em seguida foi adicionado 100 µL da suspensão de bactérias a cada poço da placa de 96 poços. Após a adição da bactéria, a placa foi incubada numa estufa por um período de sete dias a 37°C, onde ao final do sétimo dia adicionou-se uma solução estéril de resazurina a 0,02%, seguido de mais 48h de incubação.

O valor da MIC foi determinado como a menor concentração capaz de prevenir a conversão da resazurina, de cor azul, para resofurina, de cor rosa. Foram considerados os resultados de três experimentos independentes para determinar o valor da MIC (Agertt *et al.*, 2013; Muradás *et al.*, 2018; Rodrigues-Junior *et al.*, 2018; Sidrônio *et al.*, 2021).

4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi avaliada através do método MTT. Para isso, duas linhagens celulares foram testadas: RAW 264.7 originada do banco de células do Rio de Janeiro, e Vero E6, cedida pelo Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, da

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Ambas as linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina (Sigma) e 0,1% de fungizona (Sigma), a 37°C, com 5% de CO₂. Foi usado uma solução estéril de tripsina-EDTA a 0,02 % para remover as células Vero da garrafa de cultivo, enquanto a Raw foi removida com o auxílio de um espalhador de células (Almeida *et al.*, 2019).

Posteriormente, as linhagens foram colocadas numa microplaca de 96 poços de fundo chato para cultivo celular, utilizando uma suspensão de 100µL de células, na proporção de 1x10³ células por poço para RAW e 7x10² células por poço para Vero, a microplaca foi incubada por 24 horas para permitir a adesão das células.

Após a adesão celular o meio de cultivo das células foi trocado para ser adicionado posteriormente os tratamentos. Os compostos foram diluídos em DMSO, com exceção do ETB, que foi diluído diretamente em DMEM com adição posterior de DMSO. As diluições partiram da concentração de 200 µg/mL até 12,5 µg/mL para Vero, e de 100 µg/mL até 6,25 µg/mL para a RAW. As células foram tratadas com 100 µL de cada concentração dos compostos e incubadas por 72 horas a 37°C com 5% de CO₂ (Amorim *et al.*, 2017; Martinelli *et al.*, 2017).

Após esse período, as células foram incubadas com 100 µL de uma solução de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo (MTT) a 1 mg/mL, protegida da luz por 3 horas. Os cristais de formazan resultantes foram secos, dissolvidos em DMSO, e a absorbância foi medida em um leitor de placas a 570 nm (Rodrigues-Junior *et al.*, 2018). Três experimentos independentes foram conduzidos em triplicata para determinar a viabilidade de cada linhagem celular. A viabilidade foi calculada pela fórmula (%Viabilidade)= [(Média da absorbância/Média da absorbância do Controle)]x100.

4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE *ARTEMIA SALINA* LEACH

A metodologia adotada para o estudo de toxicidade com *A. salina* foi adaptada conforme descrito por Solis *et al.* (1992). Aproximadamente 0,5 g de ovos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial, composta por 35 g de sal marinho por litro

de água mineral, acrescida de 6 mg/L de fermento biológico (Meyer *et al.*, 1982).

Os ovos foram mantidos sob aeração constante a 25°C por um período de 48 horas. Após a eclosão, de 10 a 20 nauplios foram distribuídos em cada poço de uma microplaca de 96 poços com auxílio de uma micropipeta.

Os compostos em questão foram dissolvidos em DMSO e subsequentemente submetidos a uma diluição em série, variando de 200 µg/mL até 6,25 µg/mL, utilizando uma solução de água destilada contendo 6 mg/L de fermento biológico. Após essa diluição, os nauplios foram submetidos ao tratamento com as diluições por um período de 24 horas, mantendo-se a temperatura de 23 a 25°C (Solis *et al.*, 1992).

Cada composto foi testado em quatro réplicas para cada concentração, assegurando-se que a concentração final de DMSO por poço atingisse 5%. No caso do ETB, destaca-se que foi dissolvido diretamente em uma solução de água destilada, sendo posteriormente adicionado DMSO devido à sua insolubilidade parcial neste solvente.

Ao término do período de exposição, a contagem de nauplios vivos e mortos foi realizada em cada poço, considerando como mortos apenas aqueles que permaneceram imóveis após 10 segundos de observação próxima a uma fonte de luz.

O controle negativo, realizado também em quatro replicatas, consistiu na incubação de 10 a 20 nauplios em água destilada com fermento biológico (6 mg/L) e 5% de DMSO, sendo considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou mortalidade igual ou inferior a 15%.

A fim de comparar a sobrevivência dos cistos em ambientes com e sem sal, foi realizado um controle utilizando água marinha artificial adicionada de fermento biológico e 5% de DMSO. O número de nauplios vivos ao final das 24 horas foi utilizado para calcular a viabilidade em relação ao aumento da concentração das drogas, a viabilidade foi calculada pela fórmula $(\%Viabilidade) = [(Teste - Controle) / Controle] \times 100$ (Meyer *et al.*, 1982; Ntungwe N *et al.*, 2020).

4.4 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ATIVIDADE COMBINADA ENTRE OS ANÁLOGOS E FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

Este ensaio foi conduzido para avaliar as atividades sinérgicas e antagônicas resultantes da combinação de fármacos, em particular, os medicamentos de primeira

linha para o tratamento da TB juntamente com o composto que demonstrou o melhor desempenho inibitório contra a cepa de MTB H37Ra. O método empregado para a condução do ensaio foi o REMA.

No âmbito deste estudo, buscou-se analisar os efeitos após a combinação entre o composto que demonstrou o menor valor da CIM contra a cepa de MTB H37Ra, e os antibióticos RIF, ETB e MOX, todos provenientes da Sigma-Aldrich.

O análogo foi dissolvido em DMSO e submetido a uma diluição em série (horizontalmente) em uma placa de 96 poços. Essa diluição permitiu a combinação do composto com concentrações até três diluições inferiores ao valor da CIM.

Os antibióticos foram testados em concentrações até três vezes abaixo do valor do seu CIM. A concentração máxima de ETB testada foi 4,42 µg/mL, enquanto a concentração máxima da RIF e MOX foi de 0,04 µg/mL e 0,14 µg/mL, respectivamente, sendo submetidos a diluição seriada (4x) e adicionados verticalmente a placa de 96 poços.

Enquanto a RIF e o MOX foram diluídos em DMSO, o etambutol foi diluído em meio Middlebrook 7H9 com 10% de OADC, sendo que o DMSO foi posteriormente adicionado ao ETB. A concentração final de DMSO no experimento foi mantida em 2,5%.

Para a realização do ensaio, a cepa *H37Ra* de MTB foi cultivada em meio Middlebrook 7h9, com adição de 10% de OADC, 0,05% de Tween 80 e 0,01% de glicerol. A suspensão bacteriana foi introduzida no experimento com uma densidade óptica de 0,006. Após a incorporação da bactéria à placa de 96 poços, esta foi incubada por sete dias a 37°C, seguidos pela adição da solução de resazurina 0,02% e mais dois dias de incubação para a leitura dos resultados (Muradás *et al.*, 2018; Sidrônio *et al.*, 2021).

A avaliação do efeito combinatório foi realizada por meio do Índice Fracionário da Concentração Inibitória (FICI), calculado pela fórmula: $FICI = (CIM\ A + B / CIM\ A) + (CIM\ B + A / CIM\ B)$. Onde CIM A + B representa a CIM da droga A combinada com a droga B, enquanto CIM B + A denota a CIM da droga B combinada com a CIM da droga A. CIM A e CIM B indicam a CIM de cada droga testada isoladamente (Almeida *et al.*, 2019).

A interpretação dos resultados do FICI considerou o sinergismo quando seu valor foi igual ou inferior a 0,5, efeito aditivo os valores de FICI dentro do intervalo entre 0,5-1, indiferença os valores >1-2, e antagonismo quando o FICI correspondeu

a valores entre 2-4 (Horváth *et al.*, 2016).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) onde foi aplicado análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM *M. Tuberculosis H37Ra*

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), constitui um ensaio microbiológico que visa quantificar a menor concentração de um composto capaz de inibir o crescimento de um microrganismo específico (Telles; Mosca, 2000) . No âmbito deste estudo, a MIC dos sete compostos testados foi determinado em relação a cepa MTB H37Ra, empregando o método de redução colorimétrica da resazurina em placa (REMA) (Sidrônio *et al.*, 2021; Taneja; Tyagi, 2007; Telles; Mosca, 2000).

Na Tabela 1, estão apresentados os valores dos MICs dos fármacos anti-TB utilizados como controles neste ensaio. Na Tabela 2, estão listados os valores do MIC dos cinco análogos do ETB e da CQ, bem como os MICs do ETB e da CQ. Neste experimento foi adicionado controle de esterilidade do meio (sem suspensão de bactéria) e de crescimento microbiano (com adição de bactéria).

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos fármacos anti-TB usados como controles positivos do ensaio com a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Fármacos anti-TB	MIC em <i>MTB</i> H37Ra (µg/mL)
RIF	0,02
MOX	0,09

Fonte: próprio autor, 2024

Os controles positivos usados para este ensaio, RIF e MOX, apresentaram valores da MIC de 0,02 µg/mL e 0,09 µg/mL respectivamente. Esse valores estão muito próximos com o que foi descrito em estudos anteriores (Sidrônio *et al.*, 2021), onde esses mesmos fármacos foram usados como controle positivo e apresentaram valores da MIC de 0,02 µg/mL para RIF e 0,07 µg/mL para MOX.

O ETB teve MIC de 4,42 µg/mL e a CQ teve MIC de 1350 µg/mL. A MIC do ETB correspondeu ao efeito inibitório esperado deste fármaco frente a MTB, visto que já é conhecido o seu potencial como agente antimicobacteriano, estando incluso como

fármaco de primeira-linha de tratamento contra TB (Sotgiu *et al.*, 2015).

O MIC tanto do CQ quanto do ETB são similares ao encontrado na literatura (Sidrônio *et al.*, 2021). Apesar de alguns estudos comprovarem o efeito imunomodulador da CQ contra TB em combinação com outros fármacos (Matt *et al.*, 2017), quando isolada ela apresentou uma MIC muito elevada, 1350 µg/mL neste estudo. O que sugere que este fármaco antimalárico tem baixo potencial contra MTB, e que o desenvolvimento de estudos para aprimorar o seu potencial anti-TB são necessários.

Tabela 2. Concentrações inibitórias mínimas (MICs) do etambutol, da cloroquina e de seus análogos contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Compostos	MIC em <i>MTB</i> H37Ra (µg/mL)
ETB	4,42
CQ	1350
DOC-76	12,5
DOC-79	25
DOC-89	25
DOC-107	25
DOC-120	25

Fonte: próprio autor, 2024

Tukulula *et al.* (2013), observou em seu estudo que análogos da CQ demonstraram aumento no potencial anti-TB em comparação com a própria CQ quando testados contra cepas de MTB H37Rv. Esses análogos apresentaram valores de MIC na faixa de 0,25 µM a 1,25 µM, enquanto a CQ apresentou uma MIC de >160 µM contra essa mesma cepa. Os análogos da CQ foram capazes de inibir a MTB até 640 vezes mais do que ela (Tukulula *et al.*, 2013).

O ETB faz parte da primeira-linha de tratamento da TB, ele se destaca dos outros fármacos da primeira-linha de tratamento por apresentar raros casos de cepas resistentes contra ele (Caminero *et al.*, 2010). Pacientes infectados com cepas de

MTB resistentes somente a INH apresentam susceptibilidade ao ETB (Caminero *et al.*, 2010), tornando ele um fármaco estratégico, pois integra o tratamento tanto de cepas com algum perfil de resistência quanto as cepas totalmente sensíveis a primeira-linha de tratamento anti-TB.

Em seu estudo Schonfeld *et al.* (2012), identificou que o ETB apresenta susceptibilidade em pacientes infectados com cepas de MTB MDR e XDR quando é detectado baixo nível de resistência, o ETB foi considerado por este autor como uma alternativa para o tratamento de MDR-TB. Apesar de ser um fármaco que pode integrar o tratamento da TB contra cepas resistentes, o ETB apresenta relação com casos de toxicidade ocular, foi estimado que 22,5 a cada 1000 pacientes que se tratam com ETB desenvolvem alguma espécie de dano ocular, que podem ser reversíveis ou não (Koul, 2015).

Diante desse perfil de toxicidade, é possível perceber que o ETB é um fármaco que poderia ser aprimorado. Na elaboração da síntese das substâncias testadas neste trabalho, os colaboradores do LPBS buscaram favorecer na série de análogos, a combinação dos grupos farmacofóricos presentes na CQ (núcleo quinolínico) e no ETB (Figura 10). A atividade inibitória dos análogos em relação à cepa MTB H37Ra indica que a união dos grupos farmacofóricos da CQ e do ETB resultou em um efeito inibitório positivo.

A série de compostos análogos ao ETB e a CQ, DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120, apresentaram valores da MIC numa faixa interessante, entre 12,5 µg/mL e 25 µg/mL. Heinrichs *et al.* (2018) determinou valor da MIC do ETB e da Capreomicina como 8 µg/mL, em MTB H37Ra; apesar de ter usado um método distinto do utilizado neste estudo, é possível estabelecer proximidade entre a MIC desses dois fármacos e a MIC das DOCs (Heinrichs *et al.*, 2018).

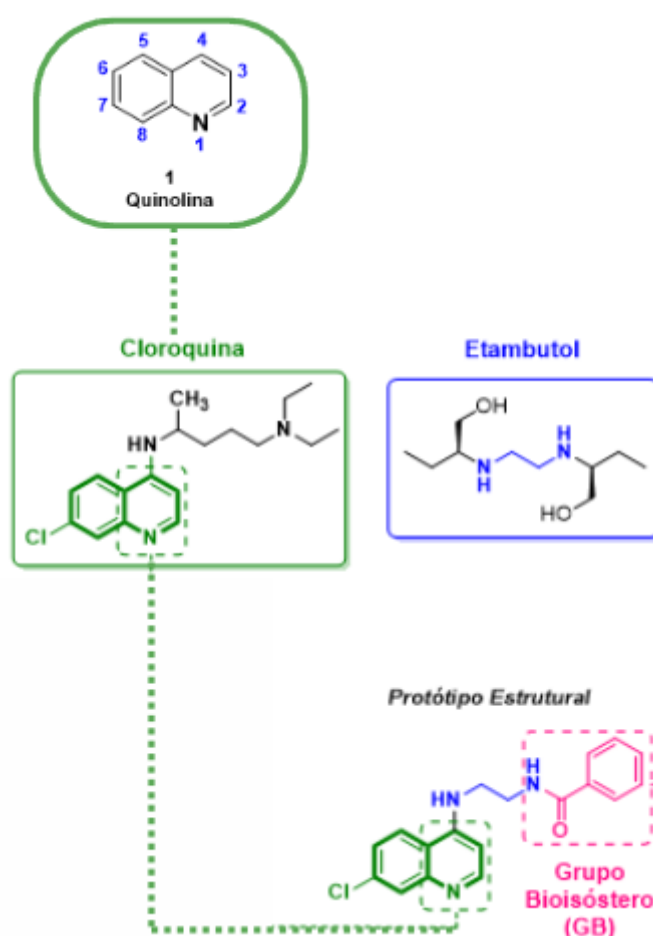
O composto da presente série de análogos que apresentou a menor MIC contra MTB foi o DOC-76, apresentando inibição a 12,5 µg/mL, esse valor é duas vezes mais baixo que a MIC dos outros análogos da mesma série, que apresentaram valores de 25 µg/mL. A DOC-76 apresentou a MIC 108 vezes mais baixa que a da CQ (com MIC de 1350 µg/mL), e 3 vezes maior que a do ETB (que apresentou MIC de 4,42 µg/mL). Os outros análogos tiveram MIC 54 vezes menor que o da CQ e quase seis vezes maior que o do ETB.

Linhares *et al.* (2023) conduziu uma pesquisa na qual foi desenvolvido uma série de análogos ao ETB. O análogo com o menor valor de MIC foi o 1b, que

apresentou inibição em uma cepa H37Rv na faixa de 1,52 μM , o ETB teve um MIC de 3,6 μM contra essa mesma cepa. O análogo 1b teve potencial de inibir a cepa H37Rv de MTB numa concentração duas vezes menor do que o próprio ETB.

Linhares *et al.* (2023) conduziu uma pesquisa na qual foi desenvolvido uma série de análogos ao ETB. O análogo com o menor valor de MIC foi o 1b, que apresentou inibição em uma cepa H37Rv na faixa de 1,52 μM , o ETB teve um MIC de 3,6 μM contra essa mesma cepa. O análogo 1b teve potencial de inibir a cepa H37Rv de MTB numa concentração duas vezes menor do que o próprio ETB.

Figura 12. Origem estrutural da série de análogos ao etambutol e a cloroquina



Fonte: Ilustração cedida pelos colaboradores do LPBS, 2023

O SQ109 é um composto análogo ao ETB, seu potencial anti-TB é estudado desde 2003, e ele está próximo a concluir os estudos clínicos de fase III e integrar a terapia anti-TB (Imran *et al.*, 2022). O SQ109 apresentou MIC de $\leq 0,2 \mu\text{g/mL}$ quando testado contra MTB H37Rv suscetível a múltiplas drogas, MIC de $0,78 \mu\text{g/mL}$ contra cepas resistentes ao ETB e a INH, e MIC de $\leq 0,39 \mu\text{g/mL}$ contra cepa resistente a RIF (Imran *et al.*, 2022).

5.2 INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

5.2.1 Avaliação da citotoxicidade com Vero E6

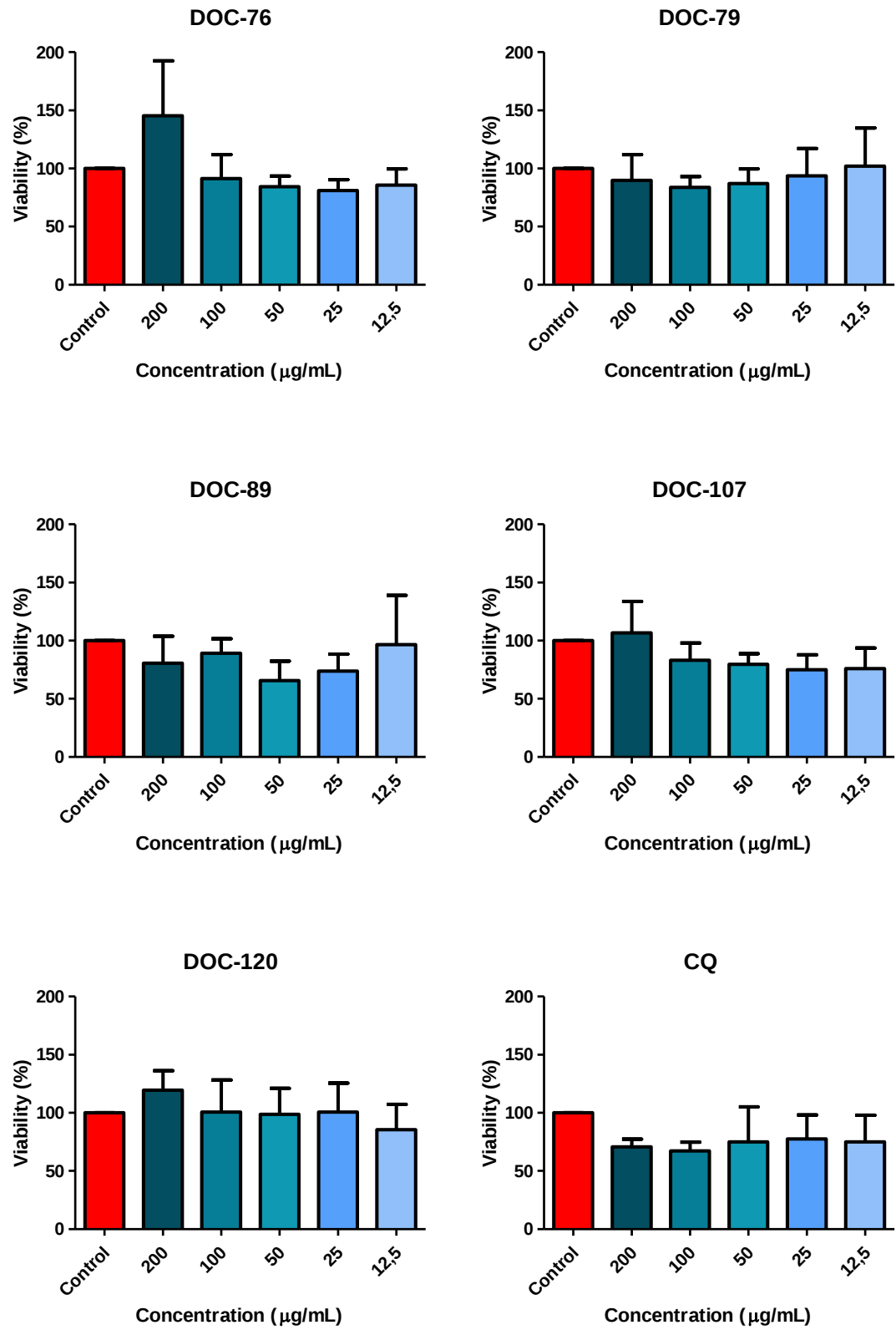
É esperado que novos fármacos propostos para integrar a terapia da TB tenham toxicidade igual ou inferior aos fármacos já disponíveis para tratamento da doença. Nesse sentido, o presente ensaio de avaliação da citotoxicidade dos análogos do ETB e CQ frente a Vero E6, permitiu concluir que esses compostos, na escala de 200 µg/mL a 12,5 µg/mL não afetaram significativamente a viabilidade da Vero E6 (Figura 11). A análise da viabilidade celular após exposição a todos os análogos não demonstrou diferenças significativas em relação ao controle.

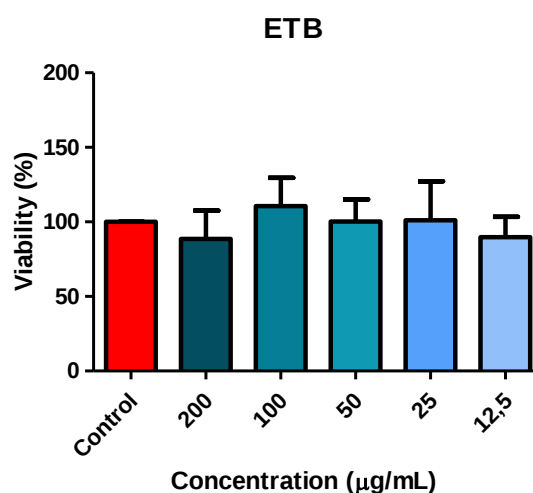
A viabilidade da linhagem Vero após tratamento com DOC-76 a 12,5 µg/mL, concentração de seu MIC, foi de 86%. Apesar da viabilidade da Vero tratada com ETB não ter sido avaliada na concentração que corresponde ao seu MIC (4,42 µg/mL), quando tratada na concentração de 12,5 µg/mL de ETB viabilidade da linhagem foi de 90%. A viabilidade da Vero após tratamento com a DOC-76 e ETB nas mesmas concentrações teve valores próximos. Após tratamento com CQ na concentração de 12,5 µg/mL a viabilidade celular da linhagem foi de 75%, indicando que a toxicidade da DOC-76 pode ser considerada mais semelhante ao ETB do que a CQ.

Apesar da viabilidade da linhagem tratada com DOC-76 não ter apresentado diferenças significativas em relação ao controle, após análise estatística (usando o pós teste de Bonferroni) foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com 200 µg/mL de DOC-76 e todos os grupos tratados com CQ e com ETB ($P < 0,05$).

Os demais análogos, DOC-79, DOC-89, DOC-107 e DOC-120, quando testados à concentração de 25 µg/mL, demonstraram viabilidades celulares de 94%, 74%, 75%, e 101%, respectivamente. Destacam-se, em termos de segurança, a DOC-120 e a DOC-79 em relação aos outros análogos, devido aos resultados de viabilidade de 101% e de 94% a uma concentração de 25 µg/mL, concentração que corresponde ao seu MIC.

Figura 13. Viabilidade da linhagem celular Vero E6 após 72 h de incubação com DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120, CQ e ETB.





Fonte: próprio autor, 2024

A uma concentração de 25 µg/mL, a viabilidade celular da linhagem Vero após tratamento com o composto ETB ficou em 101%, enquanto após tratamento com CQ foi de 78%. Observou-se que a viabilidade celular dos compostos DOC-79, DOC-89, DOC-107 e DOC-120, também à concentração de 25 µg/mL, está comparativamente próxima às viabilidades observadas para o ETB e a CQ.

As modificações estruturais que resultaram na DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120 não demonstraram impacto significativo na viabilidade da linhagem celular Vero E6, quando comparadas com os fármacos CQ e ETB. Além disso, observa-se através de análise estatística que não há discrepâncias significativas entre os grupos tratados com as DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120 e a CQ e ETB.

Embora raros, existem casos de associação entre alguns antibióticos utilizados na terapia anti-TB e toxicidade renal (Buziashvili *et al.*, 2019). Ao mesmo tempo que a poliquimioterapia direcionada para o tratamento da TB é importante para o sucesso do tratamento e redução da resistência micobacteriana, a combinação entre RIF, PZA e INH pode induzir nefrotoxicidade (Sharma *et al.*, 2019).

A RIF, principal fármaco da terapia anti-TB, se destaca entre os outros fármacos por ser mais associada a reações adversas tóxicas. Uma dessas reações é nefrotóxica, seu uso pode estar associado a nefrite intersticial aguda, falência da função renal, e dano tubular (Beebe; Seaworth; Patil, 2015). O uso da RIF também pode ser acompanhado de outras complicações como anemia, trombocitopenia e dano hepático (Chiba *et al.*, 2013).

A RIF não é o único fármaco empregado na terapia anti-TB que foi relatado como causador de eventos nefrotóxicos. Em seu estudo, Busiazhivili *et al.* (2019),

avaliou a nefrotoxicidade de dois fármacos que integram a segunda-linha de tratamento contra TB, Canamicina e Capreomicina, em pacientes infectados com MDR-TB e XDR-TB. O estudo concluiu que 54% dos pacientes em tratamento desenvolveram algum dano renal em decorrência ao uso desses fármacos.

Assim como os fármacos citados, há relatos do uso do ETB ser associado ao dano renal glomerular e tubular, além de dano hepático (Hasanuddin; Muis; Minhajat, 2022). O surgimento de cepas multirresistentes obriga o paciente com TB a exposição prolongada aos quimioterápicos. Por conta disso, a busca por fármacos com toxicidade reduzida é de extrema importância.

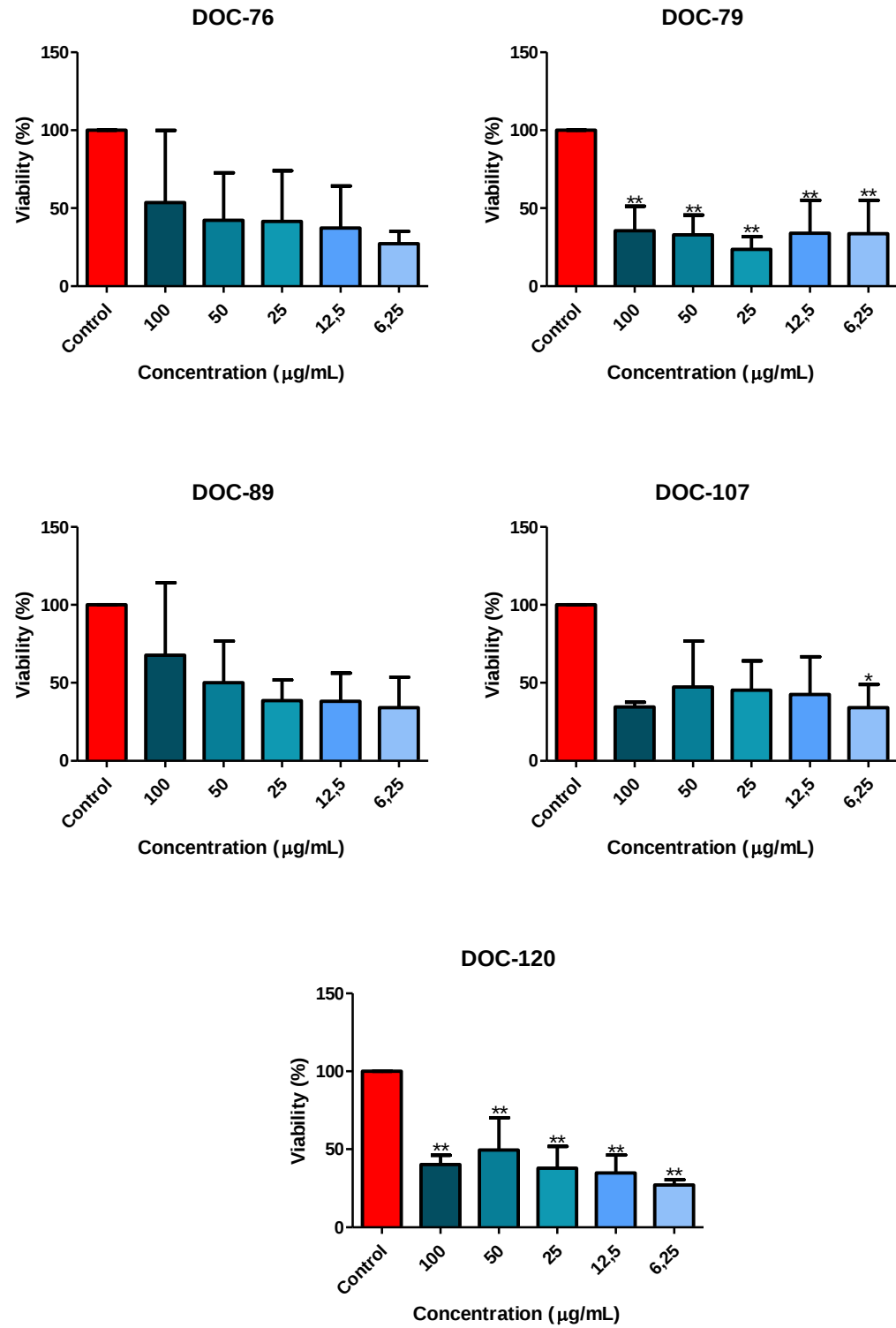
5.2.2 Avaliação da citotoxicidade com RAW 264.7

A viabilidade da linhagem celular RAW 264.7 (macrófagos murinos) após tratamento com as moléculas DOCs foi avaliada com o intuito de investigar, posteriormente, a atividade intracelular das DOCs em um modelo de infecção *in vitro* com MTB (Rodrigues-Junior *et al.*, 2016). Os resultados obtidos nestes experimentos permitiram concluir que todas as DOCs foram citotóxicas para a linhagem em questão, reduzindo a viabilidade celular (Figura 12).

Na Tabela 3, é possível observar que todos os análogos reduziram mais que 50% da viabilidade celular. Para o desenvolvimento de um modelo de infecção por MTB em macrófagos murinos é necessário que o composto apresente baixa toxicidade aos macrófagos (Gonçalves *et al.*, 2012; Rodrigues-Junior *et al.*, 2016). A baixa viabilidade da RAW 264.7 após o tratamento por 72h com as DOCs, indica que a avaliação da atividade intracelular desses análogos em um modelo de infecção por MTB seria comprometida pela toxicidade desses compostos.

É possível observar que a RAW 264.7 se mostrou muito mais sensível ao tratamento com as DOCs do que a Vero E6. A atividade intracelular das DOCs em um modelo de infecção *in vitro* por MTB é importante para avaliar se elas possuem o mesmo potencial inibitório que foi observado nos experimentos de susceptibilidade (determinação do MIC), porém dentro da célula.

Figura 14. Viabilidade da linhagem RAW 264.7 frente a DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120 após 72h de tratamento. * e ** correspondem a $P<0,05$ e a $P<0,01$, respectivamente.



* e ** correspondem a $P<0,05$ e a $P<0,01$, respectivamente.

Fonte: próprio autor, 2024

Tabela 3. Viabilidade (% $\pm$ SD) da DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107 e DOC-120 frente a RAW 264.7 em 72h de tratamento, na concentração do MIC.

Compostos	Viabilidade (% $\pm$ SD) em Raw 264.7 na concentração do MIC
DOC-76	37,7 $\pm$ 15,6
DOC-79	23,55 $\pm$ 5,8
DOC-89	38,7 $\pm$ 7,6
DOC-107	45,3 $\pm$ 10,8
DOC-120	40,0 $\pm$ 8,1

Fonte: próprio autor, 2024

5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE *ARTEMIA SALINA* LEACH

A Figura 13 mostra o resultado da viabilidade da *Artemia salina* após 24h de exposição aos tratamentos com DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120, CQ e ETB. Pode-se observar que as DOC-76, DOC-79 e DOC-120 foram os análogos que menos afetaram a viabilidade da *Artemia salina*. Os tratamentos com DOC-76, DOC-79 e DOC-120 resultaram em viabilidades similares às daquelas dos grupos tratados com CQ e com ETB nas concentrações de 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL e 6,25 μ g/mL. Além disso a análise estatística indicou que as DOC-76, DOC-79 e DOC-120 não demonstraram diferenças significativas em relação ao controle.

A DOC-89 na concentração 200 μ g/mL e 100 μ g/mL, e a DOC-107 na concentração 200 μ g/mL reduziram significativamente a viabilidade da *Artemia salina* quando comparadas ao grupo controle. A DOC-89 nas concentrações de 50 μ g/mL, 100 μ g/mL e 200 μ g/mL e DOC-107 nas concentrações de 100 μ g/mL e 200 μ g/mL afetaram a viabilidade da *Artemia salina*, o tratamento com 200 μ g/mL DOC-107 levou 100% da população de *Artemia salina* à morte, este pode ser considerado o grupo mais tóxico contra o crustáceo de toda a série.

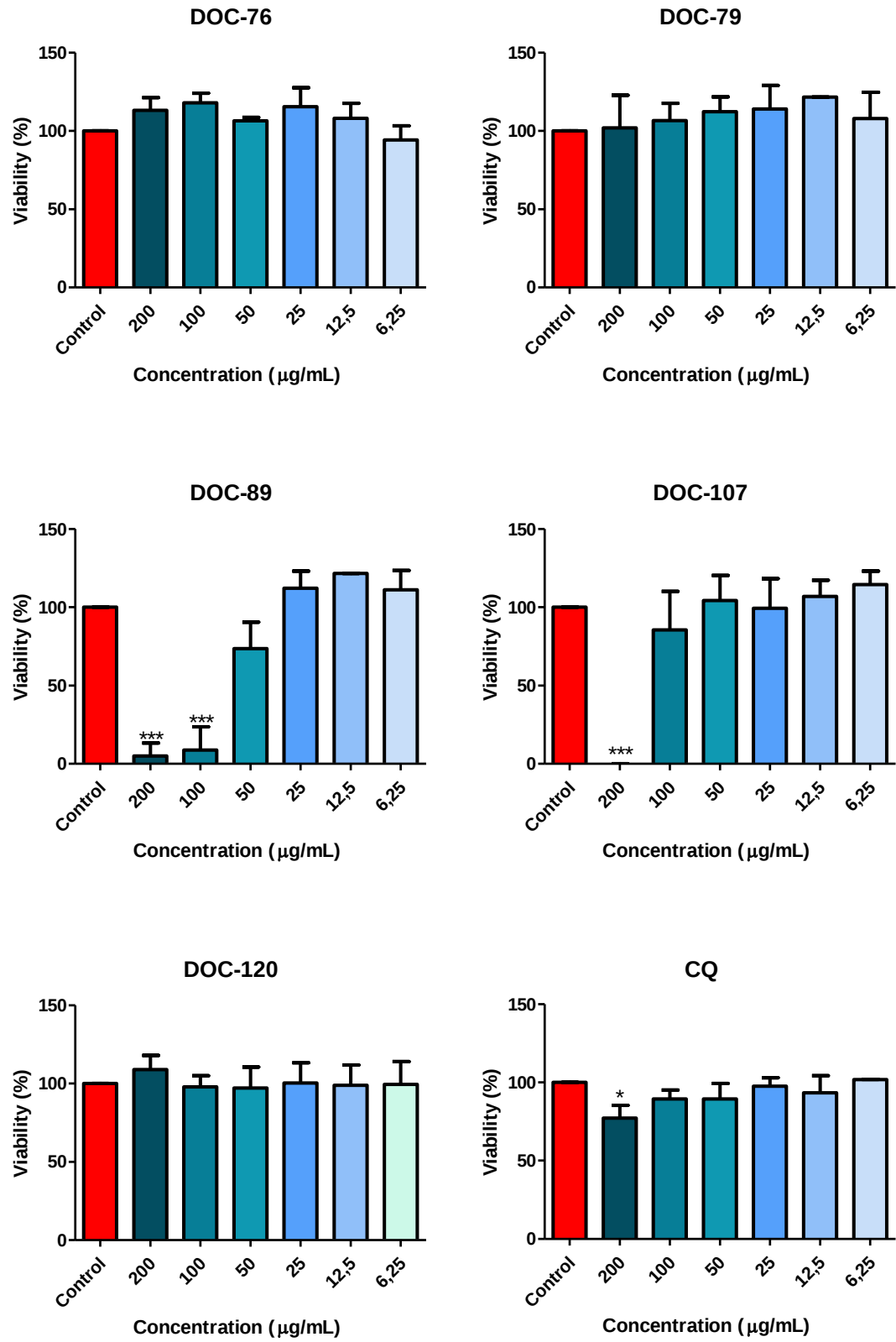
O ensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina* representa um método muito utilizado para prever toxicidade no âmbito de projetos de desenvolvimento de fármacos (Rajabi *et al.*, 2015). É uma metodologia acessível e de baixo custo para avaliação toxicológica preliminar, caracterizado pela simplicidade operacional e

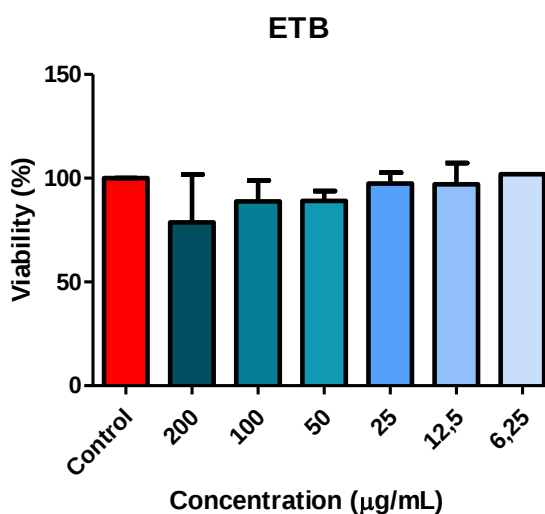
recursos minimizados (Pecoraro *et al.*, 2021). A *Artemia salina* é um microcrustáceo de fácil manuseio que se desenvolve em condições simples, conferindo facilidade à execução do método (Pecoraro *et al.*, 2021). No entanto, é importante notar que, apesar de suas vantagens, esta técnica possui limitações significativas.

A *Artemia salina* revela-se menos sensível na determinação precisa do caráter tóxico de uma substância devido às diferenças entre a fisiologia humana e a dos invertebrados (Ntungwe *et al.*, 2020). Outras divergências, como as relacionadas à constituição proteica e à complexidade do sistema imunológico, podem induzir a resultados falso negativos. Não obstante essas limitações, o método é considerado uma alternativa válida de análise, ocupando um espaço intermediário entre os testes *in vitro* e os ensaios pré-clínicos em animais (Ntungwe *et al.*, 2020).

Nos nossos experimentos, a comparação da sobrevivência da *Artemia salina* em um ambiente com e sem sal revelou que a viabilidade da *Artemia salina* nos poços tratados com sal e 5% de DMSO foi de 88%, enquanto a viabilidade nos poços tratados apenas com 5% de DMSO foi de 98%. Isso indica que a exclusão do sal no experimento além de ter melhorado a solubilidade das DOCs, do ETB e da CQ, não afetou de forma tão acentuada a sobrevivência da *A. salina*.

Figura 15. Sobrevivência da *Artemia salina* frente a DOC-76, DOC-79, DOC-89, DOC-107, DOC-120, CQ e ETB após 24h de tratamento.





* e *** indicam que $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente.

Fonte: próprio autor, 2024

5.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ATIVIDADE COMBINADA ENTRE A MOLÉCULA DOC-76 E FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

Por ter sido o análogo da série que apresentou maior potência contra a MTB H37Ra isoladamente (Tabela 2), a DOC-76 foi combinada com a RIF, MOX e ETB. Na tabela 4 estão reportados os resultados da interação entre três fármacos anti-TB e a DOC-76 contra a cepa de MTB H37Ra.

A partir dessas combinações foi possível identificar que DOC-76 apresentou interação indiferente em combinação com o MOX e o ETB, e apresentou interação aditiva quando combinada com a RIF (Figuras 11, 12, 13).

Nesse ensaio foi possível observar que a DOC-76 combinada com a RIF, MOX e ETB não alterou negativamente o MIC desses fármacos anti-TB contra MTB H37Ra, não havendo antagonismo entre eles e a DOC-76. Em combinação com a RIF (Figuras 11 e 12), a DOC-76 demonstrou efeito aditivo. A interação aditiva é caracterizada pela redução do valor do MIC 1x quando os dois compostos são combinados, nesse caso o valor do MIC dos dois compostos foi reduzido.

A ausência de antagonismo entre combinações de fármacos é uma característica necessária para doenças que dependem de um tratamento poliquimioterápico como a TB, que envolve o uso concomitante de mais de três fármacos com diferentes mecanismos de ação (Meletiadiis *et al.*, 2010).

Tabela 4. Combinações entre o derivado da cloroquina e etambutol de maior potência, DOC-76, e os fármacos anti-TB rifampicina, moxifloxacino e etambutol.

Fármacos combinados	MIC (µg/mL)		FICI	Interação
	Individual	Combinado		
76	12,5	6,25	1	Aditiva
RIF	0,02	0,01		
76	12,5	6,25	1	Aditiva
RIF	0,02	0,01		
76	12,5	12,5	2	Indiferente
MOX	0,07	0,07		
76	12,5	12,5	2	Indiferente
MOX	0,07	0,07		
76	12,5	12,5	2	Indiferente
ETB	4,42	4,42		
76	12,5	12,5	2	Indiferente
ETB	4,42	4,42		

Fonte: próprio autor, 2024

A ausência de antagonismo entre combinações de fármacos é uma característica necessária para doenças que dependem de um tratamento poliquimioterápico como a TB, que envolve o uso concomitante de mais de três fármacos com diferentes mecanismos de ação (Meletiadiis *et al.*, 2010).

Nesse contexto, para que um novo fármaco seja considerado um candidato promissor para integrar a terapia anti-TB, é crucial que ele demonstre não apenas um bom potencial inibitório isolado contra o MTB, mas também uma boa atividade em combinação com outros fármacos aos quais será associado.

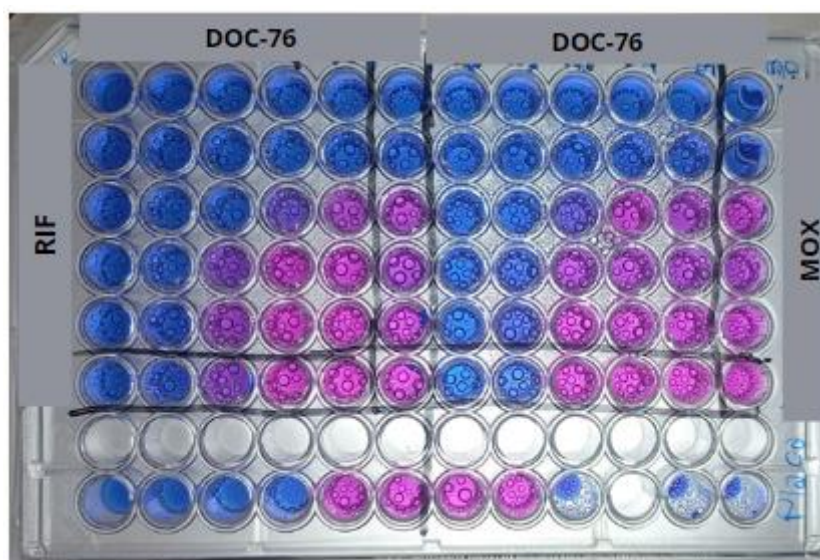
Em seu estudo, Linhares *et al.* (2023) identificou, em sua série de análogos ao ETB, a presença de efeito aditivo entre três desses análogos e a RIF, bem como entre o ETB, quando testados com uma cepa H37Rv de MTB. Dentro dessa série, apenas um análogo mostrou uma interação sinérgica com a RIF, o análogo 1b, com um FICI de 0,38, este mesmo análogo também apresentou efeito aditivo em combinação com o ETB.

Martin *et al.* (2023), em seu estudo sintetizou uma série de compostos que compartilham o mesmo núcleo quinolínico do CQ e das DOCs, esses compostos são denominados tetraidroisoquinolinas (THIQs). Ao avaliar a interação entre as THIQs, o ETB e a RIF contra *Mycobacterium aurum*, foi observado que três compostos

apresentaram sinergismo em combinação com RIF. Somente um composto da série teve interação sinérgica quando combinada com o ETB (Martin *et al.*, 2023).

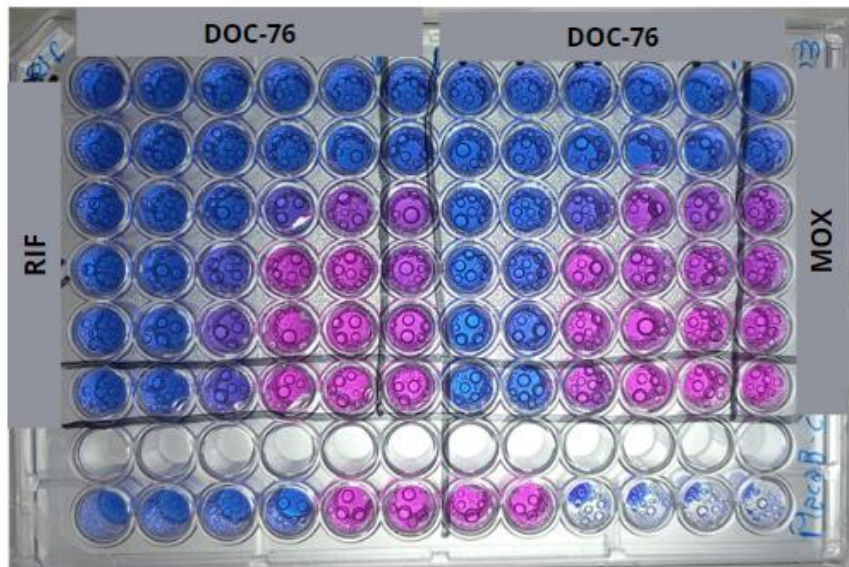
Apesar da DOC-76 ter mostrado uma interação indiferente em combinação com o ETB e MOX, a combinação desses fármacos não resultou em antagonismo, o que pode ser considerado um aspecto positivo para a continuação da investigação do potencial anti-TB da DOC-76. O efeito aditivo que a DOC-76 demonstrou em combinação com a RIF, indica que ela é uma boa candidata a fármaco anti-TB.

Figura 16. Ensaio de combinação entre DOC-76 e rifampicina (lado esquerdo) e DOC-76 e moxifloxacino (lado direito) contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.



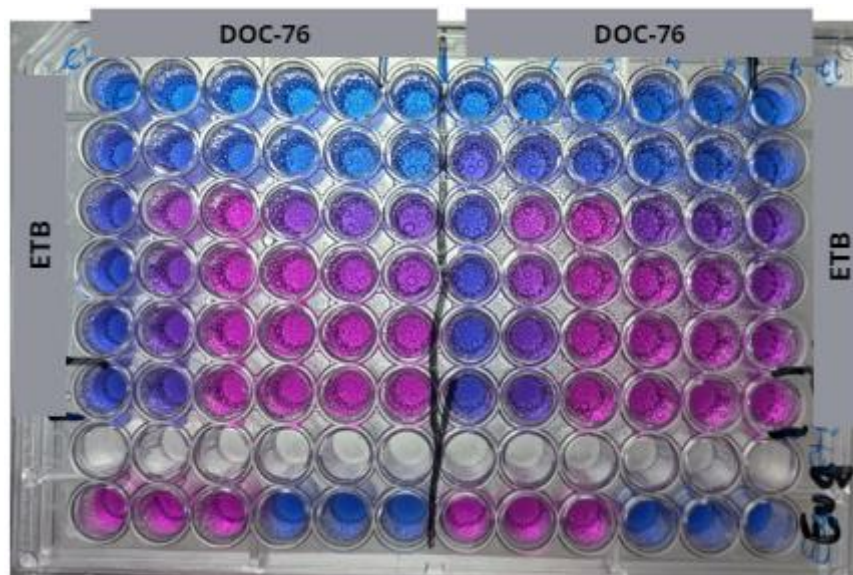
Fonte: próprio autor, 2024

Figura 17. Ensaio de combinação entre DOC-76 e rifampicina (lado esquerdo) e DOC-76 e moxifloxacino (lado direito) contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.



Fonte: próprio autor, 2024

Figura 18. Ensaio de combinação entre DOC-76 e etambutol contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.



Fonte: próprio autor, 2024

6 CONCLUSÕES

Os análogos ao ETB e a CQ, apresentaram potencial antimicobacteriano contra a cepa de MTB H37Ra, o análogo que teve maior potencial contra a MTB foi a DOC-76.

Na avaliação da citotoxicidade das DOCs na linhagem celular Vero E6 elas não demonstraram uma toxicidade superior àquela observada com o ETB e CQ na concentração de seus respectivos MICs.

A avaliação da citotoxicidade com a linhagem celular RAW 264.7 permitiu concluir que as DOCs afetaram a viabilidade celular dessa linhagem.

Na avaliação da toxicidade no modelo de *Artemia salina*, as DOCs na concentração de seus respectivos MICs não demonstraram redução da viabilidade em relação ao controle.

A molécula líder do estudo foi selecionada como a DOC-76, houve efeito aditivo na combinação entre a DOC-76 e RIF, e interação indiferente na combinação entre a DOC-76, ETB e MOX.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, S. D. *et al.* Multidrug resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9,153 patients. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 8, 2012.
- ALMEIDA, A. L. D.; CALEFFI-FERRACIOLI, k. R. C.; SCODRO, R. B. DE L.; BALDIN, V. P.; MONTAHOLO, D. C.; SPRICIGO, L. F.; NAKAMURA-VASCONCELOS, S. S.; HEGETO, L. A.; SAMPIRON, E. G.; COSTACURTA, G. F.; YAMAZAKI, D. A DOS. S.; GAUZE, G. DE F.; SIQUEIRA, V. L. D.; CARDOSO, R. F. Eugenol and derivatives activity against *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria and other bacteria. **Future Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 331–344, 2019.
- ALSAYED, S. S. R.; GUNOSEWOYO, H. Tuberculosis: Pathogenesis, current treatment regimens and new drug targets international journal of molecular sciences. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, v. 24, n. 6, p. 5202, 2023.
- AMORIM, C. F.; GALINA, L.; CARVALHO, N. B.; SPEROTTO, N. D. M.; PISSINATE, K.; MACHADO, P.; CAMPOS, M. M.; BASSO, L. A.; RODRIGUES-JUNIOR, V. S.; CARVALHO, E. M.; SANTOS, D. S. Inhibitory activity of pentacyano (isoniazid) ferrate(II), IQG-607, against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania braziliensis*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 2017.
- AN, Q.; LI, C.; CHEN, Y.; DENG, Y.; YANG, T.; LUO, Y. Repurposed drug candidates for antituberculosis therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 192, n. , p. 112175, 2020.
- BAGHAEI, P.; TABARSI, P.; DORRIZ, D.; MARJANI, M.; SHAMAEI, M.; POORAMIRI, V.; MANSOURI, D.; FARNIA, P.; MASJEDI, M.; VELAYATI, A. Adverse effects of multidrug-resistant tuberculosis treatment with a standardized regimen: a report from Iran. **American journal of therapeutics**, v. 18, n. 2, p. e29-e34, 2011. Disponível em: <www.americantherapeutics.com>. Acesso em: 20 mar. 2024.
- BAO, J, WANG, L., SUN, J. Inhibition of mycobacteria proliferation in macrophages by low cisplatin concentration through phosphorylated p53-related apoptosis pathway. **PLoS ONE**, v. 18, n. 1, p. e0281170, 2023.
- BARBERIS, I.; BRAGAZZI, N. L.; GALLUZZO, L.; MARTINI, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 58, n. 1, p. E9, 2017.
- BARBIER, M.; WIRTH, T. The evolutionary history, demography, and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 2016.
- BARUAH, U. K.; GOWTHAMARAJAN, K.; RAVISANKAR, V.; KARRI, V. V. S. R.; SIMHADRI, P. K.; SINGH, V. Optimisation of chloroquine phosphate loaded nanostructured lipid carriers using Box–Behnken design and its antimalarial efficacy. **Journal of Drug Targeting**, v. 26, n. 7, p. 576–591, 2018.

BEEBE, A.; SEAWORTH, B.; PATIL, N. Rifampicin-induced nephrotoxicity in a tuberculosis patient. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 1, p. 13–15, 2015.

BERMUDEZ, L. E.; MEEK, L. Mefloquine and its enantiomers are active against *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* and in macrophages. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2014, p. 1–5, 2014.

BRASIL, Ministério Da Saúde. **Secretaria de Vigilância Em Saúde**. Boletim Epidemiológico de Tuberculose, 2020.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Anais Churchill Livingstone**, v. 3, n. 1-3, p. 91-97, 2003.

BUZIASHVILI, M.; MIRTSKHULAVA, V.; KIPIANI, M.; BLUMBERG, H. M.; BALIASHVILI, D.; MAGEE, M. J.; FURIN, J. J.; TUKVADZE, N.; KEMPKER, R. R. Rates and risk factors for nephrotoxicity and ototoxicity among tuberculosis patients in Tbilisi, Georgia. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 23, n. 9, p. 1005–1011, 1 set. 2019.

CAMBAU, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 3, p. 196-201, 2014.

CAMINERO, J. A.; SOTGIU, G.; ZUMLA, A.; MIGLIORI, G. B. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 621-629, 2010.

CARTER, D. J.; GLAZIOU, P.; LÖNNROTH, K.; SIROKA, A.; FLOYD, K.; WEIL, D.; RAVIGLIONE, M.; HOUBEN, R. M. G. J.; BOCCIA, D. The impact of social protection and poverty elimination on global tuberculosis incidence: a statistical modelling analysis of Sustainable Development Goal 1. **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 5, p. e514–e522, 2018.

CARVALHO, A. C. C.; CARDOSO, C. A. A.; MARTIRE, T. M.; MIGLIORI, G. B.; SANT'ANNA, C. C. Epidemiological aspects, clinical manifestations, and prevention of pediatric tuberculosis from the perspective of the End TB strategy. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 134-144, 2018.

CHANDRA, P.; GRIGSBY, S. J.; PHILIPS, J. A. Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 12, p. 750-766, 2022.

CHIBA, S.; TSUCHIYA, K.; SAKASHITA, H.; ITO, E.; INASE, N. Rifampicin-induced acute kidney injury during the initial treatment for pulmonary tuberculosis: A case report and literature review. **Internal Medicine**, v. 52, n. 21, p. 2457–2460, 2013.

COHEN, S. B.; GERN, B. H.; URDAHL, K. B. The Tuberculous Granuloma and Preexisting Immunity. **Annual review of immunology**, v. 40, p. 589-614, 2022.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–1870, 2006.

DARTOIS, V. A.; RUBIN, E. J. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 11, p. 685-701, 2022.

DEGIACOMI, G.; MAKAROV, V.; PASCA, M. R.; CHIARELLI, L. R. New Drugs and Novel Cellular Targets against Tuberculosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 13680, 2022, 2022.

EJALONIBU, MURTALA A.; OGUNDARE, S. A.; ELRASHEDY, A. A.; EJALONIBU, MORUFAT A.; LAWAL, M. M.; MHLONGO, N. N.; KUMALO, H. M. Drug discovery for *Mycobacterium tuberculosis* using structure-based computer-aided drug design approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13259, 2021.

EZQUERRA-AZNÁREZ, J. M.; DEGIACOMI, G.; GAŠPAROVIČ, H.; STELITANO, G.; SAMMARTINO, J. C.; KORDULÁKOVÁ, J.; GOVERNA, P.; MANETTI, F.; PASCA, M. R.; CHIARELLI, L. R.; RAMÓN-GARCÍA, S. The Veterinary Anti-Parasitic Selamectin Is a Novel Inhibitor of the *Mycobacterium tuberculosis* DprE1 Enzyme. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 771, 2022.

FUKUNAGA, R.; GLAZIOU, P.; HARRIS, J. B.; DATE, A.; FLOYD, K.; KASAEVA, T. Morbidity and Mortality Weekly Report Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Meeting Global Targets-Worldwide. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 70, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/>>. Acesso em 10 mar 2024.

GARTINI, S.; BOUGRINI, Y.; RHAZARI, M.; BOURKADI, J. E. Macrophagic activation syndrome revealing disseminated multifocal tuberculosis: A case report of a rare clinical situation. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 76, 2022.

GONÇALVES, R. S. B.; KAISER, C. R.; LOURENO, M. C. S.; BEZERRA, F. A. F. M.; SOUZA, M. V. N. DE; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M. S. V.; HENRIQUES, M. D. G. M. D. O.; COSTA, T. Mefloquine-oxazolidine derivatives, derived from mefloquine and arenecarbaldehydes: In vitro activity including against the multidrug-resistant tuberculosis strain T113. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 243–248, 2012.

HASANUDDIN, R.; MUIS, M.; MINHAJAT, R. Ethambutol Effect on Renal and Hepatic Tissue Changes: A Literature Review. **International Journal of Research and Review**, v. 9, n. 7, p. 502–507, 2022.

HERSHKOVITZ, I.; DONOGHUE, H. D.; MINNIKIN, D. E.; MAY, H.; LEE, O. Y. C.; FELDMAN, M.; GALILI, E.; SPIGELMAN, M.; ROTHCHILD, B. M.; BAR-GAL, G. K. Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. **Tuberculosis**, v. 95, n. S1, p. S122–S126, 2015.

HOAGLAND, D. T.; LIU, J.; LEE, R. B.; LEE, R. E. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.

102, p. 55-72, 2016, 2016.

HORTON, K. C.; HOEY, A. L.; BÉRAUD, G.; CORBETT, E. L.; WHITE, R. G. Systematic review and meta-analysis of sex differences in social contact patterns and implications for tuberculosis transmission and control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 5, p. 910, 2020.

HORVÁTH, G.; BENCSIK, T.; ÁCS, K.; KOCSIS, B. Sensitivity of ESBL-producing gram-negative bacteria to essential oils, plant extracts, and their isolated compounds. antibiotic resistance: mechanisms and new antimicrobial approaches. **Acad. Press Amst.** p. 239–269, 2016.

HUDELSON, R. Gender differentials in tuberculosis: the role of socio-economic and cultural factors. *Tubercle and Lung Disease*, v. 77, n. 5, p. 391-400, 1996.

IVANEIDE, R.; LL, M.; RHB, P.; SED, S.; LEAL, I.; RODRIGUES, A.; LIMA MONTEIRO, L.; HEVELLINE, R.; PACHECO, B.; DIAS DA SILVA, S. É. Abandono do tratamento de tuberculose em co-infectados TB/HIV. **Esc Enferm USP**. v. 44, n. 2, p. 383-387, 2010. Disponível em: <www.ee.usp.br/reeusp/>. Acesso em 5 mar 2024.

IMRAN, M. *et al.* MmpL3 inhibition as a promising approach to develop novel therapies against tuberculosis: a Spotlight on SQ109, clinical studies, and patents. **Literature Biomedicines**, v. 10, n. 11, p. 2793, 2022.

JOHNSON, R.; STREICHER, E. M.; LOUW, G. E.; WARREN, R. M.; HELDEN, P. D. VAN; VICTOR, T. C. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Current issues in molecular biology**, v. 8, n. 2, p. 97-112, 2006. Disponível em: <www.cimb.org>. Acesso em 13 mar 2024.

KHAWBUNG, J. L.; NATH, D.; CHAKRABORTY, S. Drug resistant Tuberculosis: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 74, p. 101574, 2021.

KHOSRAVI, A. D.; SIROUS, M.; ABSALAN, Z.; TABANDEH, M. R.; SAVARI, M. Comparison of *rra* and *rrb* Efflux pump genes expression in drug-susceptible and -resistant *mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients in Iran. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3437–3444, 2019.

KOUL, P. A. Ocular toxicity with ethambutol therapy: Timely recaution. **Lung India**, v. 32, n. 1, p. 1-3, 2015.

LINHARES, L. A. *et al.* In vitro bioevaluation and docking study of dihydrosphingosine and ethambutol analogues against sensitive and multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, p. 115579, 2023.

LÖNNROTH, K.; JARAMILLO, E.; WILLIAMS, B. G.; DYE, C.; RAVIGLIONE, M. Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. **Social Science and Medicine**, v. 68, n. 12, p. 2240–2246, jun. 2009.

LOUGHEED, K. E. A.; TAYLOR, D. L.; OSBORNE, S. A.; BRYANS, J. S.; BUXTON,

R. S. New anti-tuberculosis agents amongst known drugs. **Tuberculosis**, v. 89, n. 5, p. 364–370, 2009.

MAHAJAN, A.; KREMER, L.; LOUW, S.; GUÉRADEL, Y.; CHIBALE, K.; BIOT, C. Synthesis and in vitro antitubercular activity of ferrocene-based hydrazones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p. 2866–2868, 2011.

MAIA, C. M. F.; MARTELLI, D. R. B.; SILVEIRA, D. M. M. L. DA; OLIVEIRA, E. A.; JÚNIOR, H. M. Tuberculosis in Brazil: the impact of the COVID-19 pandemic. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 48, p. e20220082, 2022.

MAITRA, A.; BATES, S. D. S.; SHAIK, M.; EVANGELOPOULOS, DI.; 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. 138–148, 2016.

MAITRA, A.; BATES, S.; KOLVEKAR, T.; DEVARAJAN, P. V.; GUZMAN, J. D.; BHAKTA, S. Repurposing-a ray of hope in tackling extensively drug resistance in tuberculosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 32, p. 50–55, 2015.

MANABE, Y. C.; BISHAI, W. R. Latent *Mycobacterium tuberculosis*—persistence, patience, and winning by waiting. **Nature medicine**, v. 6, n. 12, p. 1327-1329, 2000.

MARAHATTA, S. B.; YADAV, R. K.; GIRI, D.; LAMA, S.; RIJAL, K. R.; MISHRA, S. R.; SHRESTHA, A.; BHATTARAI, P. R.; MAHATO, R. K.; ADHIKARI, B. Barriers in the access, diagnosis and treatment completion for tuberculosis patients in central and western Nepal: A qualitative study among patients, community members and health care workers. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, 2020.

MARTIN, L. T.; LAMMING, E. D.; MAITRA, A.; MORTAZAVI, P. N.; RODDAN, R.; WARD, J. M.; BHAKTA, S.; HAILES, H. C. C-1 Substituted isoquinolines potentiate the antimycobacterial activity of rifampicin and ethambutol. **Frontiers in Antibiotics**, v. 2, p. 1095013, 2023.

MARTINELLI, L. K. B. *et al.* Functional, thermodynamics, structural and biological studies of in silico-identified inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP(CoA) reductase enzyme. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 46696, 2017.

MARTINO, M. DE; LODI, L.; GALLI, L.; CHIAPPINI, E. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, p. 350, 2019.

MASSABNI, A. C.; BONINI, E. H. Tuberculose: história e evolução dos tratamentos da doença. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 22, n. 2, p. 6–34, 2019.

MATT, U. *et al.* Chloroquine enhances the antimycobacterial activity of isoniazid and pyrazinamide by reversing inflammation-induced macrophage efflux. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 1, p. 55–62, 2017.

MELETIADIS, J.; POURNARAS, S.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Defining fractional

inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 602–609, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. A.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. *Brine Shrimp*: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MURADÁS, T. C. *et al.* Pre-clinical evaluation of quinoxaline-derived chalcones in tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 2018.

MURRAY, J. F.; SCHRAUFNAGEL, D. E.; HOPEWELL, P. C. Treatment of tuberculosis: A historical perspective. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. 12, p. 1749-1759, 2015.

NATARAJAN, A.; BEENA, P. M.; DEVNIKAR, A. V.; MALI, S. A systemic review on tuberculosis. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 67, n. 3, p. 295-311, 2020.

NEZENEGA, Z. S.; PERIMAL-LEWIS, L.; MAEDER, A. J. Factors influencing patient adherence to tuberculosis treatment in ethiopia: a literature review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 15, p. 5626, 2020.

NOSCHKA, R.; WONDANY, F.; KIZILSAVAS, G.; WEIL, T.; WEIDINGER, G.; WALTHER, P.; MICHAELIS, J.; STENGER, S. Gran1: A granulysin-derived peptide with potent activity against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, 2021.

NTUNGWE N, E.; DOMÍNGUEZ-MARTÍN, E. M.; ROBERTO, A.; TAVARES, J.; ISCA, V. M. S.; PEREIRA, P.; CEBOLA, M.-J.; RIJO, P. Artemia species: an important tool to screen general toxicity samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 6 abr. 2020.

OXLADE, O.; MURRAY, M. Tuberculosis and Poverty: Why Are the Poor at Greater Risk in India? **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e47533, 2012.

PAI, M. Tuberculosis. Nature Reviews Disease Primers. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 2020,2016.

PECORARO, R.; SCALISI, E. M.; MESSINA, G.; FRAGALÀ, G.; IGNOTO, S.; SALVAGGIO, A.; ZIMBONE, M.; IMPELLIZZERI, G.; BRUNDO, M. V. Artemia salina: A microcrustacean to assess engineered nanoparticles toxicity. **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 3, p. 531–536, 2021.

PENG, B.; LU, M. Understanding the prevention and cure of plagues in Daoist medicine. **Traditional Medicine Research**, v. 6, n. 5, p. 42, 2021.

POPOVICI, C.; PAVEL, C. M.; SUNEL, V.; CHEPTEA, C.; DIMITRIU, D. G.; DOROHAI, D. O.; DAVID, D.; CLOSCA, V.; POPA, M. Optimized synthesis of new thiosemicarbazide derivatives with tuberculostatic activity. **International Journal of**

Molecular Sciences, v. 22, n. 22, p. 12139, 2021.

PRASAD, R.; SINGH, A.; GUPTA, N. Adverse drug reactions with first-line and second-line drugs in treatment of tuberculosis. **Annals of the National Academy of Medical Sciences**, v. 57, n. 01, p. 15–35, 2021.

QUEIROZ, A.; RILEY, L. W. Bacterial immunostat: *Mycobacterium tuberculosis* lipids and their role in the host immune response. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 09-18, 2017.

RAHLWES, K. C.; DIAS, B. R. S.; CAMPOS, P. C.; ALVAREZ-ARGUEDAS, S.; SHILOH, M. U. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Virulence**, v. 14, n. 1, p. 2150449, 2023.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 1-6, 2015.

RAMACHANDRAN, G.; SWAMINATHAN, S. Safety and tolerability profile of second-line anti-tuberculosis medications. **Drug Safety**, v. 38, p. 253-269, 2015.

REID, M. J. A. *et al.* Building a tuberculosis-free world: The Lancet Commission on tuberculosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10178, p. 1331-1384, 2019.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S. *et al.* Mefloquine and its oxazolidine derivative compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 2, p. 203–207, 2016.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S.; PAIL, P. B.; VILLELA, A. D.; FALCÃO, V. C. A.; DADDA, A. S.; ABBADI, B. L.; PESQUERO, J. B.; SANTOS, D. S.; BASSO, L. A.; CAMPOS, M. M. Effect of the bradykinin 1 receptor antagonist SSR240612 after oral administration in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Tuberculosis**, v. 109, p. 1–7, 2018.

SACHAN, R. S. K. *et al.* Overcoming *Mycobacterium tuberculosis* Drug Resistance: Novel Medications and Repositioning Strategies. **ACS Omega**, v. 8, n. 36, p. 32244-32257, 2023.

SAMBANDAMURTHY, V. K. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Δ RD1 Δ panCD: A safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. **Vaccine**, v. 24, n. 37–39, p. 6309–6320, 2006.

SCHOEMAN, J. H.; WESTAWAY, M. S.; NEETHLINGT, A. The Relationship between Socioeconomic Factors and Pulmonary Tuberculosis. **International Journal of Epidemiology**, v. 20, n. 2, p. 435-440, 1991. Disponível em: <<http://ije.oxfordjournals.org/>>. Acesso em: 4 mar 2024.

SHARMA, R.; BATTU, P.; SINGLA, M.; GOYAL, N.; SHARMA, V. L. Expression profile

of markers of oxidative stress, injury and apoptosis in anti-tuberculosis drugs induced nephrotoxicity. **Nephrology**, v. 24, n. 7, p. 689–695, 2019.

SIA, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections . **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, p. 10, 2019.

SIDRÔNIO, M. G. S. *et al.* Effects of tafenoquine against active, dormant and resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 128, p. 102089, 2021.

SILVA, D. R.; MELLO, F. C. DE Q.; D'AMBROSIO, L.; CENTIS, R.; DALCOLMO, M. P.; MIGLIORI, G. B. Tuberculosis and COVID-19, the new cursed duet: What differs between Brazil and Europe? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 47, n. 2, p. e20210044, 2021a.

SILVA, D. R. *et al.* Tuberculosis and COVID-19, the new cursed duet: What differs between Brazil and Europe? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 47, n. 2, p. e20210044, 2021b.

SINGH, A.; PRASAD, R.; BALASUBRAMANIAN, V.; GUPTA, N. Drug-resistant tuberculosis and hiv infection: Current perspectives. **HIV/AIDS-Research and Palliative Care**, p. 9-31, 2020.

SINGH, V.; CHIBALE, K. Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 10, p. 2361–2376, 2021.

SMITH, N. H.; HEWINSON, R. G.; KREMER, K.; BROSCHE, R.; GORDON, S. V. Myths and misconceptions: The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 537–544, 2009.

SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M.; DAVID PHILHIPSON, ANDJ. A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). **Planta medica** ,v. 59, n. 03, p. 250-252, 1993.

SOTGIU, G.; CENTIS, R.; D'AMBROSIO, L.; BATTISTA MIGLIORI, G. Tuberculosis treatment and drug regimens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 5, 2015.

SULTANA, Z. Z.; HOQUE, F. U.; BEYENE, J.; AKHLAK-UL-ISLAM, M.; KHAN, M. H. R.; AHMED, S.; HAWLADER, D. H.; HOSSAIN, A. HIV infection and multidrug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2021.

TANEJA, N. K.; TYAGI, J. S. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 288–293, 2007.

TELLES, M. A. S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Evaluation of the use of microtitre plate technique to

determine the minimal inhibitory concentration of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1/2, p. 16-9, 2000.

TS'UN-YAN, L. The taoists' knowledge of tuberculosis in the twelfth century. **T'oung Pao**, p. 285-301, 1971.

TUCZYŃSKA, M.; MATTHEWS-KOZANECKA, M.; BAUM, E. Accessibility to Non-COVID Health Services in the World During the COVID-19 Pandemic: Review. **Frontiers in Public Health**, v. 9, p. 760795, 2021.

TUKULULA, M.; SHARMA, R. K.; MEURILLON, M.; MAHAJAN, A.; NARAN, K.; WARNER, D.; HUANG, J.; MEKONNEN, B.; CHIBALE, K. Synthesis and antiplasmodial and antimycobacterial evaluation of new nitroimidazole and nitroimidazooxazine derivatives. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 128–131, 2013.

TYAGI, A. K.; DHAR, N. Recent Advances in Tuberculosis Research in India. [s.d.].
UNISSA, A. N.; SUBBIAN, S.; HANNA, L. E.; SELVAKUMAR, N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Genetics and Evolution**, v. 45, p. 474-492, 2016.

WORDL HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report. 2022.

WORDL HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report. 2023.

WILBURN, K. M.; FIEWEGER, R. A.; VANDERVEN, B. C. Cholesterol and fatty acids grease the wheels of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. **Pathogens and disease**, v. 76, n. 2, p. fty021, 2018.