



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**DANIELLE MARTINIANO DA SILVA RODRIGUES**

**Estudo *in vitro* de avaliação da eficácia de novos compostos derivados de triazol frente a cepas sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis***

**RECIFE**  
**2021**

**DANIELLE MARTINIANO DA SILVA RODRIGUES**

**Estudo *in vitro* de avaliação da eficácia de novos compostos derivados de triazol frente a cepas sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-Orientadora: Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel

**RECIFE**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R696e Rodrigues, Danielle Martiniano da Silva  
Estudo in vitro de avaliação da eficácia de novos compostos derivados de triazol frente a cepas sensíveis de Mycobacterium tuberculosis / Danielle Martiniano da Silva Rodrigues. - 2021.  
48 f.

Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.  
Coorientadora: Lilian Maria Lapa Montenegro Pimentel.  
Inclui referências e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

1. Tuberculose. 2. Resistência. 3. Triazol. 4. Drogas antituberculose. I. Porto, Ana Lucia Figueiredo, orient. II. Pimentel, Lilian Maria Lapa Montenegro, coorient. III. Título

DANIELLE MARTINIANO DA SILVA RODRIGUES

**Estudo *in vitro* de avaliação da eficácia de novos compostos derivados de triazol frente a cepas sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis***

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Titular)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

---

Msc. Romário Martins Araújo (Titular)

Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz-PE

---

Bsc. Luanna de Ângelis Correia de Sousa (Titular)

Instituto Aggeu Magalhães – LIKA/UFPE

---

Msc. Aline dos Santos Peixoto (Suplente)

Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz-PE

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a minha mãe, que me ensinou sobre o amor em seus pequenos gestos de cuidado, sua força e coragem me inspiram a nunca desistir dos meus sonhos.

A minha avó, por todo suporte emocional, cuidado e amor, sempre vibrando a cada pequena conquista minha.

A meus queridos amigos, Amanda, Andreza, Bárbara, Daniel, Eduardo, Kayke, Lucca, Matheus, Stefanny e Victor, por todo carinho, incentivo, cuidado e amor. Faltam palavras para descrever o quão sou imensamente grata pela presença de cada um em minha vida.

A Felipe, que esteve presente em cada etapa, me incentivando a ser sempre a melhor versão de mim mesma.

A Glauce, minha eterna mentora, por ter acreditado em mim e oferecido todo seu ensinamento, se tornando, além de tudo, uma grande amiga.

Aos meus colegas de laboratório, sempre prontos para ajudar uns aos outros, tornando cada dia mais fácil.

À minha orientadora, Lílian Montenegro e à chefe do departamento, Haiana Schindler, pela oportunidade e confiança, sempre oferecendo os ensinamentos necessários.

A UFRPE, além de todo acolhimento e suporte, tornou-se um lugar que, durante quatro anos, eu pude chamar de casa.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, por toda a infraestrutura oferecida, bem como seus funcionários.

Aos órgãos de fomento CNPq e FACEPE, pelo apoio financeiro que possibilitou esta pesquisa.

A todos que não foram citados aqui mas, que de forma direta ou indireta, sempre torceram por mim e contribuíram para que este momento pudesse se concretizar.

## RESUMO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa responsável por um alto número de casos em todo o mundo. Provocada pela espécie *Mycobacterium tuberculosis*, é transmitida de pessoa a pessoa através da via aérea, pela inalação de bacilos provindos de um indivíduo infectado, apresentando baciloscopia positiva. O tratamento convencional consiste no uso de quatro fármacos de primeira linha: rifampicina, etambutol, isoniazida e pirazinamida. Em decorrência da baixa aderência terapêutica, o mundo enfrenta atualmente uma grande problemática de resistência bacteriana, que dificulta o tratamento, tornando-o mais tóxico e longo, podendo durar por até dois anos. Em razão disso, faz-se necessário o desenvolvimento de novas moléculas, capazes de eliminar o bacilo causador da tuberculose de forma rápida e com baixo ou nenhum efeito adverso para serem utilizadas no tratamento. Grande parte dos medicamentos utilizados atualmente são compostos por estruturas heterocíclicas, assim como muitos compostos em desenvolvimento que apresentam resultados promissores. Em especial uma classe de compostos, os triazóis, que possuem ampla aplicação biológica. Sendo assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar compostos heterocíclicos derivados de triazóis contra cepas sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis*, como candidatos a novas moléculas para o tratamento da tuberculose, através de estudos da atividade biológica *in vitro*. Foi avaliado o índice de concentração inibitória mínima e a citotoxicidade em linhagem macrofágica Raw 264.7 e hepatócitos HepG2 de compostos derivados de triazol, bem como o tipo de interação que estes apresentam com fármacos de primeira linha para o tratamento da tuberculose. Todos os compostos apresentaram baixa a relevante atividade contra o bacilo, com CIM variando de 64 a 4 µg/ml para cepa H37Rv e de >64 a 8 µg/ml para cepa H37Ra. Os compostos com melhores resultados foram A48 e A51, selecionados para avaliação da atividade do índice de concentração inibitória fracionada, com os fármacos rifampicina e etambutol, em que ambos se mostraram indiferentes. Os resultados obtidos neste estudo indicam a ação inibitória micobacteriana dos derivados de triazol avaliados, como possíveis agentes farmacológicos, oferecendo parâmetros para o seguimento de testes *in vitro*.

**Palavras-chave:** Tuberculose. Resistência. Triazol. Drogas antituberculose.

## ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease responsible for a high number of cases worldwide. Caused by the *Mycobacterium tuberculosis* species, it is transmitted from person to person through the airway, through the inhalation of bacilli from an infected individual, with positive bacilloscopy. Conventional treatment consists of the use of four first-line drugs: rifampicin, ethambutol, isoniazid and pyrazinamide. As a result of low therapeutic adherence, the world is currently facing a major problem of bacterial resistance, which makes treatment difficult, making it more toxic and longer, and may last for up to two years. For this reason, it is necessary to develop new molecules capable of eliminating the bacillus that causes tuberculosis quickly and with little or no adverse effects to be used in the treatment. Most of the drugs currently used are composed of heterocyclic structures, as well as many compounds under development that show promising results. In particular a class of compounds, the triazoles, which have wide biological application. Therefore, this study aimed to evaluate heterocyclic compounds derived from triazoles against sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis*, as candidates for new molecules for the treatment of tuberculosis, through *in vitro* biological activity studies. The minimum inhibitory concentration index and cytotoxicity in macrophage strain Raw 264.7 and HepG2 hepatocytes of triazole-derived compounds were evaluated, as well as the type of interaction they present with first-line drugs for the treatment of tuberculosis. All compounds showed low to relevant activity against the bacillus, with MIC ranging from 64 to 4 µg/ml for the *H37Rv* strain and >64 to 8 µg/ml for the *H37Ra* strain. The compounds with the best results were A48 and A51, selected for evaluation of the activity of the fractioned inhibitory concentration index, with the drugs rifampicin and ethambutol, in which both were indifferent. The results obtained in this study indicate the mycobacterial inhibitory action of the evaluated triazole derivatives, as possible pharmacological agents, offering parameters for the follow-up of *in vitro* tests.

**Keywords:** Tuberculosis. Resistance. Triazole. Antituberculosis drugs.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da Estreptomicina	19
Figura 2 - Estrutura química da Isoniazida	20
Figura 3 - Estrutura química da Rifampicina	21
Figura 4 - Estrutura química da Pirazinamida	22
Figura 5 - Estrutura química do Etambutol	23
Figura 6 - Estrutura química de 1H-1,2,3-Triazole	25
Figura 7 - Esquema de placa de 96 poços para realização do CIM	30
Figura 8 - Esquema de placa de 96 poços para realização de FIC	32



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos compostos derivados de triazol utilizados no estudo	27
Tabela 2 - Valores de concentração inibitória mínima dos compostos derivados de triazol e fármacos de referência.	33
Tabela 3 - Valores de citotoxicidade dos derivados de triazol e fármacos de referência frente a linhagem macrofágica Raw e hepatócitos HepG2.	34
Tabela 4 - Índice de seletividade dos compostos derivados de triazol e fármacos de referência para linhagem macrofágica Raw 264.7 e hepatócitos HepG2.	35
Tabela 5 - Atividade dos compostos derivados de triazol em junção aos fármacos de referência.	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	<i>Bacilo Calmette-Guérin</i>
BK	Bacilo de Koch
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMTB	Complexo Mycobacterium tuberculosis
EMB	Etambutol
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
SM	Streptomicina
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TB-HIV	Coinfecção Tuberculose-HIV
TB MDR	Tuberculose Multidroga resistente
TB XDR	Tuberculose Extensivamente resistente
WHO	World Health Organization
μM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>15</b>
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	15
2.2 PATOGÊNESE	16
2.3 TRANSMISSÃO	17
2.4 TRATAMENTO	18
2.5 TERAPIA MEDICAMENTOSA	19
2.5.1 Estreptomicina	19
2.5.2 Isoniazida	20
2.5.3 Rifampicina	21
2.5.4 Pirazinamida	22
2.5.5 Etambutol	23
2.6 DERIVADOS DE TRIAZOL	24
<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS	27
4.2 MICRORGANISMO	27
4.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	28
4.4 ANTIMICROBIANOS	28
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	29
4.6 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (CC50)	30
4.7 ÍNDICE DE SELETIVIDADE	31
4.8 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA	31
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	33
5.2 CITOTOXICIDADE	34
5.3 ÍNDICE DE SELETIVIDADE	35
5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA	36

<b>DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
REFERÊNCIAS	41

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença que está presente desde meados do século XVII, na época popularmente conhecida como peste branca, responsável por um alto índice de mortalidade no continente europeu, se tornando a principal causa de morte em todo o mundo no fim do século XIX (SAVACOOOL, 1986; DUCATI *et al.*, 2006). Durante a revolução industrial ocorreu a primeira epidemia da doença, em razão do aumento da densidade populacional e das condições de vida desfavoráveis. Essa doença é causada em humanos majoritariamente pela bactéria da espécie *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), sendo considerada uma doença infectocontagiosa (BAÑULS *et al.*, 2015).

Em meados do século XX, a incidência da TB começou a diminuir, em razão aos esforços para erradicação da doença, como a introdução da vacina BCG em 1921 e antimicrobianos, como estreptomicina (SM), isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB), nos anos seguintes. Porém, em 1980 a incidência da TB voltou a aumentar, devido principalmente à emergência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), afetando até mesmo países desenvolvidos. Além disso, esse aumento no número de casos foi associado à deterioração das condições de saúde nas grandes cidades e ao aparecimento de resistência aos antibióticos, tornando o manejo dessa doença ainda mais difícil (PETRINI; HOFFNER, 1999; BAÑULS *et al.*, 2015; DUCATI *et al.*, 2006).

Em 2019, cerca de 10 milhões de pessoas foram acometidas pela tuberculose em todo o mundo e 1,2 milhão morreram devido à doença. Dentre esses óbitos, 4,5 mil ocorreram apenas no Brasil, o que corresponde a um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes. Em 2020, o Brasil registrou 66.819 novos casos pela doença, sendo os estados do Amazonas, Rio de Janeiro, Pernambuco e Pará, os que apresentam os maiores índices de óbitos confirmados (BRASIL, 2021).

Apesar do alto número de casos registrados no ano de 2020, estima-se que estes sejam ainda maiores, pois o mundo vivencia atualmente uma pandemia ocasionada pelo novo coronavírus, o SARS-CoV-2. Em decorrência da sintomatologia semelhante à tuberculose há, de forma indireta, uma subnotificação de casos de TB, bem como atraso no diagnóstico e por consequência, no início do tratamento (HUF & KRITSKI, 2012; UNDERNER et al., 2020).

Em países subdesenvolvidos, como o Brasil, alguns grupos populacionais possuem maior vulnerabilidade para a TB, apresentando um maior risco de adoecimento pela doença. É o caso de pessoas vivendo em situação de rua, privadas de liberdade e/ou indígenas. Outro agravante é a presença do vírus HIV, que torna o seu portador debilitado e suscetível a infecções, sendo a tuberculose a principal causa de óbito entre essas pessoas (BRASIL, 2019).

Apesar da disponibilidade de fármacos que apresentam atividade contra o *Mtb*, diferentes formas resistentes a medicamentos estão em ascensão, o que requer esforços na busca por novos compostos eficazes e estratégias de tratamento (PETRINI & HOFFNER, 1999; CHEVALIER et al., 2014). É bem sabido que cepas mutantes resistentes estão naturalmente presentes em qualquer grande população de bactérias. Porém, a má administração dos fármacos anti-TB contribui para seleção dessas cepas resistentes, provocando uma predominância de bactérias mutantes sobre as demais, podendo levar à resistência aos medicamentos a toda população bacteriana (DUCATI et al., 2006).

A baixa aderência aos fármacos de tratamento da TB ocorre, principalmente, em razão dos efeitos adversos causados pela terapia medicamentosa e ao longo tempo de tratamento. No Brasil, entre 2015 e 2020, foram identificados 7.749 novos casos de TB drogarresistente, dos quais 98% apresentavam a forma pulmonar da doença, ou seja, com capacidade de transmissão do bacilo (BRASIL, 2020). Na Assembleia Mundial da Saúde do ano de 2014, foi proposta uma nova estratégia global de combate à doença, chamada de Estratégia para o Fim da Tuberculose (*End TB Strategy*). A proposta tem como visão um mundo livre da tuberculose até o ano de 2035. Para isso, investimentos e esforços globais são essenciais, para desenvolver métodos aprimorados para diagnosticar, tratar e prevenir a doença (UPLEKAR et al., 2015; BRASIL, 2019).

O desenvolvimento de novas moléculas eficazes contra a *Mtb* é uma medida essencial para ser utilizada como estratégia no controle da doença no Brasil e no mundo (WHO, 2020). Novas moléculas candidatas devem encurtar o tratamento padrão da tuberculose, apresentar baixa toxicidade e serem suficientemente eficazes contra a forma resistente da doença. Além disso, a implementação de uma nova molécula exige diretrizes que atestem sobre sua segurança e possível melhora na qualidade de vida dos pacientes, sendo considerada um "sucesso terapêutico". Entretanto, esse processo é longo e bastante oneroso, dificultando o surgimento de novos medicamentos anti-TB (LIMA *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, pesquisas científicas no desenvolvimento de novas moléculas antituberculinicas têm sido enfaticamente produzidas. Atualmente, alguns compostos estão em fase de desenvolvimento clínico, enquanto outros estão em fase de investigação pré-clínica, na tentativa da descoberta de novas moléculas para serem usadas no tratamento da TB (SHEHZAD *et al.*, 2013).

Na literatura existe um elevado número de estruturas heterocíclicas reportadas como potenciais agentes antituberculose (KATRITZK & RACHWAL, 1997). Dentre elas, os triazóis, de origem exclusivamente sintética, que nos últimos anos tem sido alvo de estudos devido à sua ampla aplicação biológica (MELO *et al.*, 2006; DIOGO *et al.*, 2013). Essa classe de compostos vem sendo bastante explorada e os estudos da relação estrutura e atividade biológica são bastante promissores (KAYASHIMA *et al.*, 2009).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

As micobactérias pertencem ao filo Actinobacteria, classe Actinomycetes, ordem Actinomycetales e família *Mycobacteriaceae*. Essa família possui apenas o gênero *Mycobacterium*, que é classificado em 3 grupos: Micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), *Mycobacterium leprae* e Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) (SOMOSKOVI & SALFINGER, 2014). A Tuberculose pode ser causada por qualquer uma das sete espécies que integram o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo elas: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*, que compartilham cerca de 99,9% de identidade em sequência de DNA, mas diferem quanto a seus hospedeiros primários (BRITES & GAGNEUX, 2015).

No âmbito da saúde pública, a espécie mais importante, por ser a principal causadora da tuberculose em humanos, é a *M. tuberculosis*. Essa bactéria foi isolada e identificada pela primeira vez pelo médico e patologista Robert Koch no ano de 1882, ficando conhecida posteriormente também como Bacilo de Koch (BK) (DUCATI *et al.*, 2006). O *M. tuberculosis* é uma bactéria intracelular gram-positiva, de aspecto ligeiramente curvo, que mede de 0,5 a 3  $\mu\text{m}$ . É um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), aeróbio estrito e com parede celular rica em lipídios (ácidos micólicos e arabinogalactano), o que lhe confere alto grau de resistência intrínseca à maioria dos antibióticos e quimioterápicos e provavelmente também contribui para a lenta taxa de crescimento, ao restringir a absorção de nutrientes. (ROSSMAN & MACGREGOR, 1995; SARAVANAN *et al.*, 2018)



Com o isolamento da cepa *H37Rv* em 1905, até então a mais bem caracterizada e suscetível a fármacos e passível de manipulação genética, foi possível a sua aplicação em diversas pesquisas biomédicas (CHEVALIER *et al.*, 2014). Devido à sua patogenicidade e transmissão de aerossol, existem diretrizes específicas de biossegurança que exigem o uso de capelas de fluxo laminar e equipamentos de instalação de nível 3 para trabalho laboratorial dessa cepa de *Mtb* (COLE *et al.*, 1998). Em 1935 essa cepa foi modificada e atenuada para não provocar a doença, originando a cepa *H37Ra*, o que possibilitou a sua utilização em laboratório de biossegurança nível 2 e ampliou os trabalhos referentes à *Mtb* (HEINRICHS *et al.*, 2018).

## 2.2 PATOGÊNESE

A TB pode acometer diferentes órgãos e sistemas do corpo, podendo se manifestar como pulmonar, que representa cerca de 80% dos casos de tuberculose no mundo, ou extrapulmonar, quando acomete qualquer outro órgão ou sistema, por disseminação linfo-hematogênica, durante a infecção pulmonar inicial (COELHO *et al.*, 2008). A apresentação clínica varia de acordo com o local de proliferação da bactéria. No caso da TB pulmonar, o indivíduo pode apresentar dores no peito, tosse persistente, sudorese noturna, febre, perda considerável de peso, cansaço excessivo e perda de apetite (FOGEL, 2015; CRUZ-KNIGHT; BLAKE-GUMBS, 2013).

Como um parasita intracelular, a bactéria habita os macrófagos, multiplicando-se dentro dessas células. À medida que a bactéria se prolifera, elas são liberadas dos macrófagos, que morrem no ambiente alveolar (DUCATI *et al.*, 2006). O destino da *Mtb* depende do sistema imunológico do hospedeiro. Em indivíduos com sistema imunológico suprimido a doença poderá se desenvolver, ocasionando a chamada primo-infecção, enquanto um sistema imunológico saudável desenvolve uma resposta imune adaptativa eficaz, que controla a replicação da bactéria, levando a uma infecção persistente sem sintomas, chamada de latência (ROSEMBERG *et al.*, 2001).

Pessoas que apresentam TB latente não possuem papel na cadeia de transmissão da doença, porém esse quadro de latência pode progredir para a forma ativa da doença, ocasionando a TB pós-primária. Estima-se que isso ocorra entre 5% a 10% das pessoas com TB latente, podendo ocorrer em razão de um alto grau de exposição ao bacilo. Indivíduos imunocomprometidos, como aqueles com infecção por HIV, câncer ou pacientes em uso de medicamentos imunossupressores, apresentam maior risco de progressão para tuberculose ativa a partir da infecção primária ou reativação (CRUZ-KNIGHT & BLAKE-GUMBS, 2013; FOGEL, 2015).

### 2.3 TRANSMISSÃO

A principal via de transmissão da TB é aérea, que ocorre a partir de indivíduos bacilíferos, pela eliminação de gotículas no ambiente através da fala, tosse ou espirro para outras pessoas. O termo bacilífero se refere a pessoas acometidas com a TB pulmonar ou laríngea, que apresentam baciloscopia positiva no escarro (CRUZ-KNIGHT & BLAKE-GUMBS, 2013). Essas gotículas liberadas são chamadas gotículas de *Pflüger*, que ao serem exaladas, rapidamente se tornam secas e transformam-se em partículas menores (núcleos de Wells), contendo os bacilos da TB, que podem manter-se em suspensão no ar por muitas horas até que sejam inalados por outra pessoa, podendo alcançar os alvéolos, onde podem se multiplicar e provocar a chamada primo-infecção (REDIER H., 1999; SÁ *et al.*, 2007).

Algumas outras vias de infecção, como pele e placenta, são raras e por isso não possuem importância epidemiológica na transmissão da doença. Além disso, crianças com TB pulmonar geralmente têm baciloscopia negativa e, por isso, também apresentam baixa importância na cadeia de transmissão da doença (REDIER H., 1999; SÁ *et al.*, 2007). O risco de transmissão pode ser reduzido com medidas simples, como utilização de máscaras e higiene pessoal constante. Além disso, em razão da alta sensibilidade do bacilo à luz solar, a circulação de ar pode possibilitar sua dispersão e diminuir o risco de transmissão da doença (BRASIL, 2019).

## 2.4 TRATAMENTO

O atual esquema terapêutico visa atender a três principais objetivos: ter atividade bactericida precoce; ser capaz de prevenir a emergência de bacilos resistentes e ter atividade esterilizante (BRASIL, 2021). A atividade bactericida precoce é a capacidade de eliminar o maior número de bacilos o mais rápido possível. Para a prevenção da seleção de bacilos resistentes é necessária a associação de diferentes fármacos, que agirão sobre os bacilos sensíveis e naturalmente resistentes, uma vez que bacilos resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro. A atividade esterilizante é a capacidade de eliminar todos os bacilos presentes no indivíduo, impedindo o reaparecimento da TB após o tratamento (COURA, 2013).

No Brasil, o esquema básico para o tratamento de adultos e adolescentes consiste em duas fases: intensiva e de manutenção. A fase intensiva tem o objetivo de reduzir rapidamente a população bacilar e por consequência diminuir o potencial de transmissão. A fase de manutenção tem a finalidade de eliminar os bacilos latentes ou persistentes e reduzir a possibilidade de recidiva da doença (BRASIL, 2019). A fase intensiva tem duração de dois meses e é composta por quatro fármacos de uso diário: rifampicina, pirazinamida, isoniazida e etambutol. Enquanto a fase de manutenção dura quatro meses, mantendo a administração de rifampicina e isoniazida. Além disso, caso o paciente já tenha feito uso de algum destes medicamentos antes da exposição à doença, é necessário a substituição do fármaco em questão, pela estreptomicina (COURA, 2013).

Apesar de ser uma doença curável, a TB enfrenta uma grande problemática no tratamento devido à alta taxa de abandono, que favorece a proliferação de cepas resistentes aos medicamentos sobre as demais, caracterizando a resistência adquirida (SARAVANAN *et al.*, 2018). Segundo a OMS, as formas mais graves de resistência são a Multidroga Resistente (MDR) e Extensivamente Resistente (XDR). TB MDR se refere à resistência a pelo menos dois fármacos essenciais do regime terapêutico, isoniazida e rifampicina. Enquanto a TB XDR é a MDR com resistência adicional às fluoroquinolonas e a pelo menos um dos medicamentos injetáveis, sendo ambos de segunda linha (HORSBURGH *et al.*, 2015; RABAHI *et al.*, 2017).

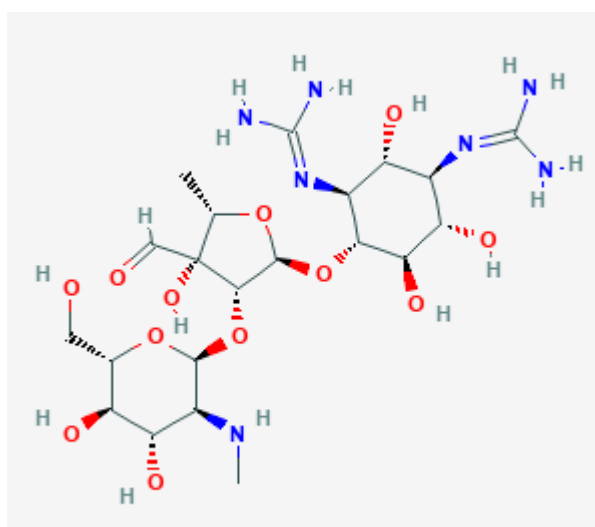
## 2.5 TERAPIA MEDICAMENTOSA

### 2.5.1 Estreptomicina

Foi o primeiro fármaco utilizado no tratamento da tuberculose 76 anos atrás. Descoberta por Albert Schatz e seus colaboradores, a partir da purificação da bactéria isolada do solo, *Streptomyces griseus* (SCHATZ *et al.*, 1944; MARSHALL *et al.*, 1948; FOX *et al.*, 1954). A estreptomicina (Figura 1) pertence ao grupo dos aminoglicosídeos que, de maneira geral, atuam inibindo a tradução do RNA mensageiro (mRNA), através da inibição da síntese proteica ao ligar-se de maneira irreversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, interferindo na integridade da membrana celular (ROSSETTI *et al.*, 2002; ARBEX *et al.*, 2010).

É considerado um fármaco bactericida contra os bacilos de multiplicação rápida (localizados no interior das cavidades pulmonares). A resistência à estreptomicina no *Mtb* ocorre por mutações no alvo do fármaco. O principal sítio de mutação é o gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12, em que ocorrem mutações resultando na substituição de um único aminoácido. Um segundo mecanismo da resistência ocorre por alterações no gene que codifica o RNA 16S (*rrs*) em duas regiões diferentes. Há também um terceiro mecanismo de resistência que pode estar relacionado a trocas na entrada do fármaco para o interior da célula bacteriana (ROSSETTI *et al.*, 2002).

Figura 1 - Estrutura química da Estreptomicina



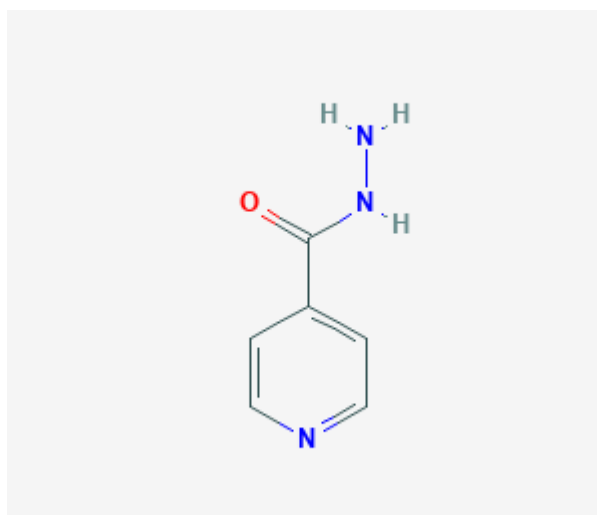
Fonte: Pubchem

### 2.5.2 Isoniazida

Conhecida desde 1952 como um potente agente anti-TB, é um dos mais antigos fármacos sintéticos utilizados no tratamento da tuberculose (ZHANG *et al.*, 1992). Possui estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida (Figura 2). A INH é um pró-fármaco que é ativado apenas ao adentrar aos bacilos, através de difusão passiva. A forma tóxica é ativada pela enzima catalase-peroxidase, codificada pelo gene *KatG* do *Mtb*, produzindo radicais reativos de oxigênio e radicais orgânicos, que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo (ARBEX *et al.*, 2010).

Os mecanismos de resistência à isoniazida podem estar associados a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam para catalase-peroxidase (*katG*), que diminuem sua atividade, impedindo a ativação do fármaco (ROSSETTI *et al.*, 2002). Apesar de ser um importante agente para o tratamento da tuberculose, alguns efeitos adversos podem ser relatados, desde náuseas e alterações de comportamentos até os mais graves, embora raros, como: neuropatia periférica, dano hepático assintomático e falência do órgão. (BISAGLIA *et al.*, 2003; ARBEX *et al.*, 2010).

Figura 2 - Estrutura química da Isoniazida



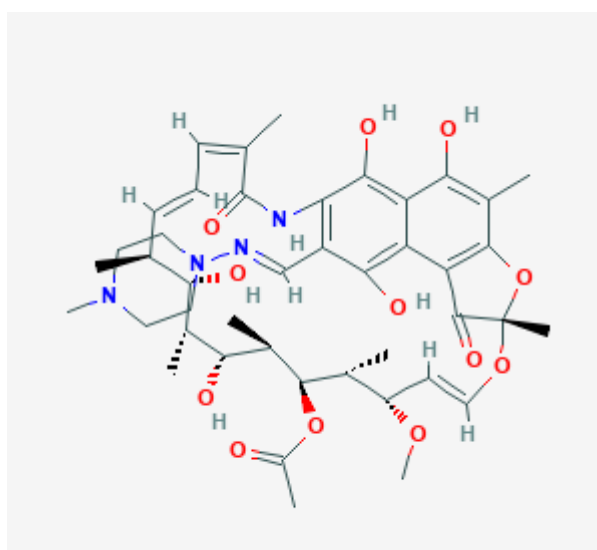
Fonte: Pubchem.

### 2.5.3 Rifampicina

A Rifampicina (Figura 3) é um fármaco semissintético, descoberta em 1957 a partir da bactéria *Amycolatopsis mediterranei* e introduzida ao esquema terapêutico da TB na década de 70, encurtando o tempo de tratamento de 18 para 9 meses (HONG KONG CHEST SERVICE, 1978; GROSSET, 1998). O mecanismo de ação da RMP consiste na inibição da transcrição gênica da micobactéria, ao acoplar-se à RNA polimerase, bloqueando assim a síntese de RNA mensageiro, responsável pela produção de proteínas essenciais para a informação genética da bactéria, ocasionando a morte celular (HEINZ & TIN-WEIN, 2005; ARBEX *et al.*, 2010).

Esse fármaco apresenta grande poder bactericida, com alta capacidade de esterilização das lesões de TB, sendo eficaz contra o bacilo metabolicamente ativo e em estado de latência (DICKINSON & MITCHISON, 1981). O mecanismo de resistência para esse fármaco já é bastante conhecido, ocorrendo devido à mutação do gene *rpoB*, que codifica a cadeia beta da RNA polimerase (ROSSETTI *et al.*, 2002; ARBEX *et al.*, 2010). Dentre os efeitos adversos causados por este medicamento estão presentes: reações cutâneas, intolerância gastrointestinal e hepatotoxicidade. Geralmente, a apresentação desses efeitos é rara e facilmente controlada com medicação adequada ou interrupção no uso do fármaco (GOMES & SIQUEIRA-BATISTA, 2010; BERTOLAMI *et al.*, 2005).

Figura 3 - Estrutura química da Rifampicina



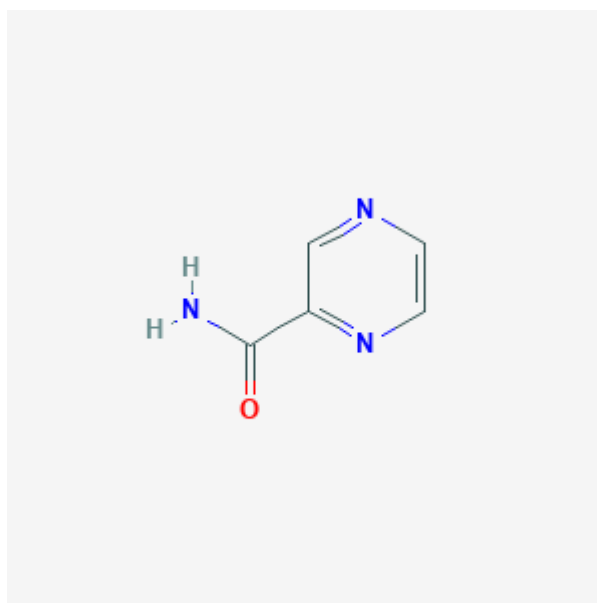
Fonte: Pubchem.

#### 2.5.4 Pirazinamida

A pirazinamida é um análogo estrutural da nicotinamida, com estrutura molecular semelhante a isoniazida (Figura 4), mas sem resistência cruzada com a mesma. Foi descoberta em 1936, porém adicionada ao esquema terapêutico apenas em 1970, levando a uma redução no tempo de tratamento de nove para seis meses. Assim como a isoniazida, também necessita ser ativada para exercer seu efeito (Zhang *et al.*, 1992; ROSSETTI *et al.* 2002). É um fármaco bactericida, com potente ação esterilizante, principalmente em meio ácido no interior dos macrófagos e em áreas de inflamação aguda (ARBEX *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação da PZA não é totalmente conhecido, porém supõe-se que ocorra a penetração no bacilo de forma passiva, sendo convertida em ácido pirazinóico por enzimas bacterianas (nicotinamidase/pirazinamidase), atingindo altas concentrações no citoplasma da bactéria. O acúmulo de ácido pirazinóico diminui o pH intracelular inativando enzimas, como a ácido graxo sintase I, fundamental para a síntese dos ácidos graxos e, em consequência, impedindo a biossíntese do ácido micólico da parede celular bacteriana. A resistência a esta droga está relacionada a mutações no gene *pncA*, que codifica a enzima nicotinamidase/pirazinamidase, impedindo a ativação do fármaco (ARBEX *et al.*, 2010)

Figura 4 - Estrutura química da Pirazinamida



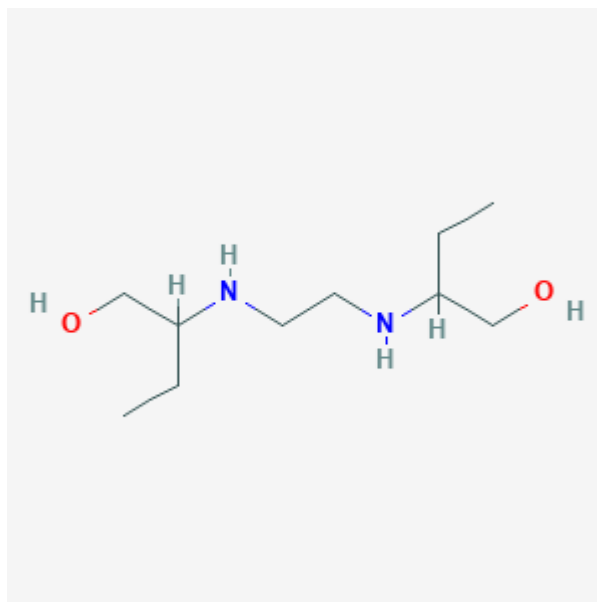
Fonte: Pubchem

### 2.5.5 Etambutol

Sintetizado em 1961, porém inserido no esquema terapêutico apenas cinco anos depois, é um agente bacteriostático contra bacilos metabolicamente ativos, que atua interferindo na biossíntese de arabinogalactano, principal polissacarídeo da parede celular da micobactéria, através da inibição da enzima arabinosil transferase, codificada pelo gene *embB*, que media a polimerização de arabinose para arabinogalactano (ROSSETTI *et al.*, 2002; ARBEX *et al.*, 2010). Sua estrutura química pode ser observada na Figura 5.

Os mecanismos de resistência a este fármaco ainda não são completamente compreendidos, porém, sabe-se atualmente que estão relacionados a alterações no gene *embB* (ZHANG *et al.*, 1992; ROSSETTI *et al.*, 2002). Assim como os demais fármacos anti-TB, pode ocasionar efeitos colaterais moderados e graves, em baixa ocorrência, como problemas gastrointestinais, cardiovasculares, neurite retrobulbar e neurite periférica, sendo reversíveis a partir do uso de medicação adequada (BISAGLIA *et al.*, 2003).

Figura 5 - Estrutura química do Etambutol



Fonte: Pubchem



## 2.6 DERIVADOS DE TRIAZOL

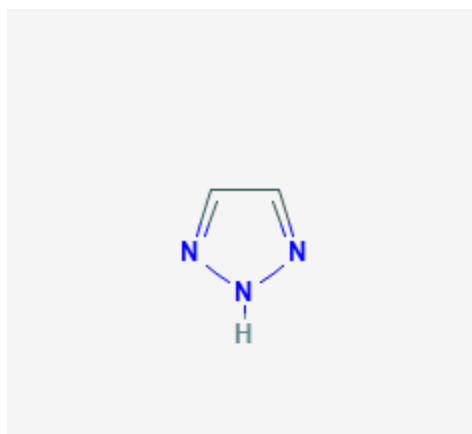
Os triazóis pertencem a uma classe de substâncias denominada azol, caracterizada pela presença de um anel heterocíclico de cinco membros, com ao menos um átomo de nitrogênio em sua estrutura química (ZHANG *et al.*, 1992). A nomenclatura do triazol refere-se aos três átomos de nitrogênio que o mesmo possui (Figura 6). O interesse por essa classe de compostos surgiu no início da década de 50, após a descoberta de várias aplicações, especialmente farmacológicas, resultando na evolução dos estudos referentes aos diversos sistemas triazólicos (MELO *et al.*, 2006).

São de origem exclusivamente sintética e nos últimos anos, essa classe de compostos, bem como seus derivados, vêm sendo bastante explorados, devido à sua ampla aplicação biológica e eficácia comprovada no tratamento de diversas doenças (KAYASHIMA *et al.*, 2009). Algumas de suas atividades farmacológicas já descritas são: antiviral (JOHNS *et al.*, 2009), analgésica (BANU *et al.*, 1999), antiprotozoária, antimicrobiana (CHEN *et al.*, 2000; SHEREMENT *et al.*, 2004), antiinflamatória, fungicida e antitumoral (DURAN *et al.*, 2002).

Diversos autores retratam na literatura o potencial que alguns derivados triazólicos apresentam frente a diferentes microrganismos. Trabalhos como os de Muthukrishnan e colaboradores, evidenciam a ação dessa classe de compostos especificamente sobre o gênero *Mycobacterium*, apresentando atividade até mesmo contra a espécie *M. tuberculosis*, demonstrando a potencial eficácia que estes apresentam como agentes anti-TB (MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2011; MUJAHID *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2018).

Estudos indicam que as propriedades favoráveis do anel triazol, como caráter dipolo moderado, capacidade de ligação de hidrogênio, rigidez e estabilidade em condições *in vivo*, são responsáveis por suas atividades biológicas aprimoradas (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Além disso, essa classe de compostos já está presente entre os fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, como a isoniazida, evidenciando a eficácia do seu potencial antimicrobacteriano (ZHANG *et al.*, 2017). Em um cenário de alta resistência bacteriana aos fármacos já existente, a utilização de derivados triazólicos como uma nova classe de compostos antituberculínicos, faz-se essencial e indica a possibilidade para criação de um novo medicamento a ser incorporado ao tratamento da TB, à fim de combater a epidemia ocasionada por esta doença (MELO *et al.*, 2006).

Figura 6 - Estrutura química de 1H-1,2,3-Triazole



Fonte: Pubchem

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar compostos heterocíclicos derivados de triazóis contra cepa sensível de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv e H37Ra), como candidatos a novas moléculas para o tratamento da tuberculose, através de estudo da atividade biológica *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o potencial antimicobacteriano *in vitro* dos novos compostos sintetizados;
- Avaliar a toxicidade *in vitro* dos novos compostos quanto a linhagens macrofágicas e hepatócitos;
- Avaliar o potencial da atividade sinérgica entre os novos compostos e fármacos tradicionais de primeira linha.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

A síntese, comprovação estrutural e caracterização dos dez compostos derivados de triazóis foi realizada no laboratório de Síntese de Compostos Bioativos, pelo Dr. Ronaldo Nascimento Oliveira, no Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco e cedidos para utilização neste estudo. A relação dos compostos obtidos é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista dos compostos derivados de triazol utilizados no estudo

Compostos derivados de triazol	
Identificação dos compostos	Peso Molecular (g/mol)
A32	297,15
A33	668,69
A35	360,25
A37	267,32
A39	652,69
A48	731,59
A51	682,72
A61	*
A62	*
A63	*

\* dados não disponibilizados

Fonte: A autora.

### 4.2 MICRORGANISMO

Para este estudo foi utilizada a cepa virulenta *H37Rv* (ATCC 27294) e avirulenta *H37Ra* (ATCC 25177) de *Mtb*. Estas foram utilizadas como cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC), fornecidas e caracterizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN – PE), classificadas como sensíveis a todos os fármacos de primeira linha.

### 4.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

As cepas de *Mtb* foram reativadas em meio Löwenstein-Jensen (Himedia) a 37°C por 2 a 3 semanas. Posteriormente as colônias foram inoculadas em caldo Middlebrook 7H9 (Sigma Aldrich) suplementado com: 10% ácido oléico, albumina bovina, dextrose, catalase (OADC, BBL/Becton-Dickinson), 0.2% de glicerol e 0.05% de Tween 80; e incubadas a 37°C por 7 a 10 dias. Os tubos de cultura foram agitados e mantidos em repouso vertical para permitir a sedimentação de grumos e minimizar a liberação de aerossóis. Em seguida o sobrenadante foi ajustado com a turbidez 01 da escala McFarland com uma diluição posterior de 1:20 (v:v) em caldo 7H9 suplementado e sem Tween 80.

### 4.4 ANTIMICROBIANOS

Os fármacos de primeira linha, rifampicina e etambutol (Sigma-Aldrich), foram utilizados como controle positivo no teste de atividade da concentração inibitória mínima, com os compostos derivados de triazol para o teste de concentração inibitória fracionada. Foi pesado 0,1g de cada antibiótico em balança analítica (CELTAC – FA2104n – 210 x 0,0001g) e dissolvido em balão volumétrico em 10mL do diluente apropriado, sendo metanol para rifampicina e água para etambutol e esterilizadas por filtro de poro 0,22µm (Millex – Merck Millipore) até o uso imediato nos experimentos. Os compostos teste foram solubilizados em DMSO, para obtenção de uma solução estoque.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da atividade dos compostos derivados de triazol foi realizada pelo método colorimétrico de microdiluição em placas de 96 poços, descrito por PALOMINO *et al.* (2002). No perímetro externo da placa foi adicionado 200 µl de água com o objetivo de evitar a evaporação dos sistemas de meio de cultura e compostos, devido ao longo período de incubação. Nos demais poços da microplaca foi adicionado 100µl de caldo 7H9 suplementado. Os compostos derivados de triazol foram adicionados em duplicata nas placas em diluições seriadas de 1:2, com concentração partindo de 64 µg/ml a 0,5 µg/ml. Uma droga de referência foi utilizada por placa, sendo rifampicina ou etambutol, partindo da concentração de 1 µg/ml para RMP e 8 µg/ml para EMB. Poços de controle positivo e controle negativo de crescimento também foram incluídos para todas as cepas testadas. Foi adicionado 100 µl do inóculo ajustado em todos os poços (Figura 9).

As placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas a 37°C em atmosfera normal por 7 dias. Após o período de incubação, 30µL de uma solução estéril de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% foi adicionada em todos os poços (exceto os que continham água) e as placas foram reincubada *overnight*, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. O CIM foi definido como a menor concentração da droga que preveniu a mudança de coloração de azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido). Uma mudança de azul para rosa indica redução de oxidação e, portanto, crescimento bacteriano. Os “pontos-de-corte” (*cut-off*) para definir susceptibilidade/resistência das cepas frente aos antimicobacterianos padrões foram: 0.5 e 5 µg/ml para RMP e EMB, respectivamente (SANCHOTENE *et al.*, 2008).

Figura 8 - Esquema de placa de 96 poços para realização do CIM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	ÁGUA	ÁGUA										ÁGUA	
B		Sentido de diluição dos compostos testes									Ant.		C+
C													C+
D													C+
E													C-
F													C-
G													C-
H		ÁGUA											

Fonte: A autora.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (CC<sub>50</sub>)

Para a realização do ensaio de citotoxicidade, o teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) foi empregado de acordo com MOSMANN (1983). Foram utilizadas as linhagens celulares de macrófagos Raw 264.7 (ATCC TIC - 71) e hepatócitos HepG2. As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI (Lifetechnology) enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB- Invitrogen), sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2mg/L). O cultivo foi incubado a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência celular. As células foram retiradas por raspagem utilizando scraper e utilizada uma concentração de 1 x 10<sup>5</sup> células/ml, ajustadas com auxílio da câmara de Neubauer, assim foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 horas nas mesmas condições iniciais de cultivo para permitir a adesão celular.

Os compostos testados partiram da concentração de 200µg/ml, realizando a diluição seriada em meio RPMI, estas soluções foram transferidas para a placa contendo as células e incubadas por 48 horas. Após este período, o meio foi retirado e adicionado 25µl de MTT solubilizado em PBS (5mg/ml). A placa foi reincubada por 2 horas nas mesmas condições de ambiente e temperatura. Após esse período, o meio foi aspirado e 100 µl de DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi medida através do filtro de 570nm em leitores de placas (MOSMANN, 1983).

Os experimentos foram realizados em triplicata e a concentração inibitória de 50% foi calculada a partir da curva concentração-resposta de cada composto. Rifampicina e etambutol foram considerados controles positivos. O valor  $CC_{50}$  foi definido como a maior concentração do composto em que 50% das células permaneceram viáveis e estimado por análises de regressão logarítmica dos valores encontrados, através do software GraphPad Prism.

#### 4.7 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A partir dos valores de citotoxicidade e concentração inibitória mínima, foi calculado o Índice de Seletividade dos compostos, conforme equação, utilizado para estimar a janela terapêutica de fármacos e identificar compostos promissores ( $IS > 10$ ), visto que, os valores do índice de seletividade indicam por quantas vezes o valor do CIM daquele composto pode ser multiplicado sem apresentar citotoxicidade (ORME, 2011; KATSUNO *et al.* 2015).

$$IS = \frac{CC50}{CIM}$$

#### 4.8 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA

Com o objetivo de determinar o tipo de interação farmacológica entre os compostos derivados de triazol e antimicrobianos de primeira linha que fazem parte do esquema de tratamento da tuberculose, rifampicina e etambutol, foi utilizado o método de checkerboard de microdiluição bidimensional. Os compostos selecionados foram os que obtiveram IS acima de 5 em ambas as linhagens de células testadas. No eixo x da placa de 96 poços foi distribuído o antimicrobiano de referência diluição seriada e no eixo y a diluição seriada do composto sintético.



Foi aplicado 200µl de água na coluna 1 (A-H) e na coluna 12 (A/B E G/H). Foi adicionado 100µl de meio 7H9 nos demais poços. Na coluna 11 foi adicionado 100µl do antibiótico padrão a ser testado realizando diluição seriada até a coluna 3. Na linha A2 até a A11 foi adicionado 100µl do composto teste na concentração 2x ou 4 x o valor do MIC realizando diluição seriada até a da linha A até a G. A coluna 2 e a linha H são, respectivamente, somente a droga teste e o antibiótico, servirão de controle do MIC do composto teste e da droga padrão respectivamente. O inóculo (padronizado MF1) foi adicionado na coluna 2 a 11 e na coluna 12 na linha C/D (Figura 10).

Figura 9 - Esquema de placa de 96 poços para realização de FIC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	ÁGUA	Controle do composto teste	↓ Sentido de diluição dos compostos testes ↓									Sentido de diluição do antibiótico de referência	ÁGUA		
B															
C															C +
D															C +
E															C -
F															C -
G															
H			Controle de antibiótico										ÁGUA		

Fonte: A autora.

As placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas a 37°C em atmosfera normal por 7 dias. Após o período de incubação, 30µL de uma solução estéril de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% foi adicionada em todos os poços e as placas foram reincubadas *overnight*, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. O FIC foi definido como a menor concentração da droga que preveniu a mudança de coloração de azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido). Através do índice de concentração inibitória fracionada foi possível determinar a interação entre as moléculas e classificá-las como sinérgica, aditiva ou antagônica. Os resultados foram interpretados calculando o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) usando a seguinte fórmula: FIC antibiótico + FIC composto = FICI. Valores de FICI ≤ 0.50 serão considerados como efeito sinérgico; > 0.50 – 4.0, indiferentes; e > 4, antagônico (CALEFFI-FERRACIOLI *et al.*, 2013).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A atividade antimicrobiana *in vitro* frente às cepas de *Mtb* sensíveis foi testada em dez compostos derivados de triazol, tendo etambutol e rifampicina como drogas de referência. Os compostos apresentaram concentrações mínimas de inibição do crescimento bacteriano que variaram de 32 a 8 ug/ml para a cepa virulenta (*H37Rv*) e de  $\geq 64$  a 4ug/ml para cepa avirulenta (*H37Ra*). Em relação a *H37Rv*, todos os compostos testados apresentaram ação inibitória de crescimento da *Mtb*. Dentre estes, o composto A48 apresentou a melhor ação, com CIM de 8ug/ml. Para a cepa *H37Ra*, oito dos dez compostos analisados conseguiram inibir o crescimento da micobactéria. O composto A48 apresentou melhor atividade também para esta cepa, com CIM de 4ug/ml (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de concentração inibitória mínima dos compostos derivados de triazol e fármacos de referência.

Compostos	CIM (ug/ml)	
	<i>H37Rv</i>	<i>H37Ra</i>
A32	32	32
A33	16	16
A35	32	32
A37	32	32
A39	16	16
A48	8	4
A51	32	16
A61	16	64
A62	16	$\geq 64$
A63	32	$\geq 64$
Rifampicina	0,125	0,062
Etambutol	1	1

## 5.2 CITOTOXICIDADE

Os compostos apresentaram efeitos moderados em relação ao teste de citotoxicidade nas células analisadas. Os maiores valores são observados na linhagem celular de hepatócitos (HEPG2), no qual os compostos A32, A33, A35 e A51 apresentam as máximas concentrações possíveis da droga, sendo de 118,7 ug, 99,46 ug, 101,8 ug e 141,63 ug, respectivamente. Para linhagem macrofágica (Raw 264.7), os valores obtidos foram mais baixos em comparação aos hepatócitos, entretanto os compostos A48 e A51 se destacaram dos demais por apresentar os maiores valores de  $CC_{50}$ , de 39,11 ug e 86,32 ug, respectivamente, mantendo ao menos 50% das células viáveis (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de citotoxicidade dos derivados de triazol e fármacos de referência frente a linhagem macrofágica Raw e hepócitos HepG2.

Compostos	$CC_{50}$ (ug)	
	Raw	HepG2
A32	38,28	118,7
A33	33,28	99,46
A35	15,67	101,8
A37	19,82	54,2
A39	28,61	19,91
A48	39,11	47,63
A51	86,32	141,2
A61	38,32	61,89
A62	25,89	44,38
A63	31,77	53,45
Rifampicina	80,39	175,9
Etambutol	> 400	> 400

Fonte: A autora.

### 5.3 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Como resultado da análise de interação entre a CIM e  $CC_{50}$ , os compostos A48 e A51 apresentaram os maiores índices de seletividade para ambas as linhagens celulares. O composto A48 apresentou valores de 9,77 para linhagem Raw e 11,9 para HEPG2. Enquanto o composto A51 apresentou valor de 5,3 para linhagem Raw e 8,82 para HEPG2. Os demais compostos apresentaram baixos valores de IS, como evidenciado na Tabela 4.

Tabela 4 - Índice de seletividade dos compostos derivados de triazol e fármacos de referência para linhagem macrofágica Raw 264.7 e hepatócitos HepG2.

Compostos	Índice de Seletividade	
	Raw	HepG2
A32	1,19	3,7
A33	2,08	6,21
A35	0,48	3,18
A37	0,61	1,69
A39	1,78	1,24
A48	9,77	11,9
A51	5,39	8,82
A61	2,39	3,86
A62	1,61	2,77
A63	0,9	1,67
Rifampicina	643,12	1407,2
Etambutol	400	400

Fonte: A autora.

#### 5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA

Com base nos critérios estabelecidos, os compostos selecionados para essa etapa foram A48 e A51, testados em relação a sua atividade antimicrobiana com os fármacos de referência rifampicina e etambutol. Ambos os compostos se mostraram indiferentes à interação com os fármacos analisados. O índice de concentração inibitória fracionada dos dois compostos foi de 1,03 para ambas os fármacos de referência utilizadas, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade dos compostos derivados de triazol em junção aos fármacos de referência.

<b>Compostos</b>	<b>FIC ant</b>	<b>FIC comp</b>	<b>FICI</b>	<b>Efeito</b>
<b>Rifampicina</b>				
A48	1	0,03	1,03	INDIFERENTE
A51	1	0,03	1,03	INDIFERENTE
<b>Etambutol</b>				
A48	1	0,03	1,03	INDIFERENTE
A51	1	0,03	1,03	INDIFERENTE

Legenda: FIC ant: Concentração Inibitória Fracionada do antibiótico padrão; FIC comp: Concentração Inibitória Fracionada dos compostos teste; FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracionada

Fonte: A autora.

## 6. DISCUSSÃO

Como exposto por Sanches (2016), a ciência brasileira necessita de investimentos. Na prática, isto pode ser observado em grande parte dos laboratórios de pesquisa não apresentarem estrutura necessária para realização de trabalhos com cepas potencialmente infectantes. Portanto, é importante reconhecer que a utilização da cepa *H37Ra* de *Mtb* permite o desenvolvimento de estudos em ambiente laboratorial de biossegurança nível 2. Entretanto, é preciso considerar que, por tratar-se de uma cepa modificada, algumas alterações podem exercer influência sobre áreas específicas de atuação dos fármacos, bem como dos compostos testados e, portanto, influenciar na obtenção de valores diferentes, quando comparada à cepa *H37Rv*. Apesar disso, os resultados obtidos a partir dessa cepa tornam-se relevantes e fundamentais, por aumentar a confiabilidade do estudo.

Muitos dos compostos aqui estudados apresentam ação na inibição do crescimento bacteriano e alguns mostram atividade promissora quando comparados a achados na literatura, embora tenham mostrado atividade inferior quando comparados aos demais fármacos de referência. O composto A48 destaca-se dos demais, por apresentar as menores concentrações capazes de inibir o crescimento da *Mtb*, o que o torna um composto promissor para o seguimento dos testes *in vitro*. Seus valores de CIM de 4µg/ml e 8µg/ml para as cepas *H37Ra* e *H37Rv*, respectivamente, aproximam-se ao de outros fármacos do tratamento da TB, como estreptomicina e etambutol, que apresentam CIM de 6,25µg/ml e 1µg/ml, respectivamente.

Como descrito por LIMA *et al.*, 2003, além de eficaz, o fármaco precisa se mostrar seguro para ser utilizado no tratamento da tuberculose, sem apresentar graves consequências ao paciente. Apesar de efeitos adversos serem observados em todos os fármacos do esquema terapêutico da TB, novos compostos devem apresentar os menores indicativos de toxicidade possíveis. Nesse contexto, o teste de citotoxicidade foi essencial para definir a segurança dos derivados de triazol em hepatócitos, onde o fármaco será metabolizado e em macrófagos, uma vez que o *Mtb* é um patógeno intracelular destas células (SMITH *et al.*, 2019).

Grande parte dos compostos apresentaram boa atividade celular, indicando segurança em sua utilização para ambas as linhagens utilizadas, podendo chegar a altas concentrações, mantendo ao menos 50% das células viáveis. O composto A51 apresenta valores de  $CC_{50}$  maiores até mesmo que a rifampicina para ambas as linhagens celulares, mostrando-se mais seguros que este fármaco para testes *in vitro*. Outros compostos, apesar de não apresentarem valores maiores que as drogas de referência, também apresentam bons valores de  $CC_{50}$ , indicando a segurança dessa classe de compostos no tratamento da tuberculose.

ZHANG e colaboradores (2019), ao estudar a atividade de derivados de triazol contra o *M. tuberculosis*, obteve resultados semelhantes, com concentração inibitória mínima variando de 3,76  $\mu\text{g/ml}$  a 72,25  $\mu\text{g/ml}$  contra cepas sensíveis e resistentes, considerando-os como moléculas promissoras. Além disso, o autor aponta o possível mecanismo de ação desses compostos como inibidores do crescimento de micobactérias, ao bloquear a biossíntese de lipídeos e/ou através de mecanismos adicionais, sendo essa uma das principais estratégias no desenvolvimento de um fármaco anti-TB eficaz.

É possível observar que alguns compostos se destacam em relação ao CIM, enquanto outros ao  $CC_{50}$ , entretanto, os resultados das metodologias abordadas precisam se relacionar de maneira que, não basta apenas demonstrar eficácia em relação ao CIM ou baixa toxicidade, é preciso que estes valores estejam integrados e o composto seja ao mesmo tempo eficaz e seguro. Em razão disso, o índice de seletividade torna-se o principal indicador do potencial que os compostos apresentam para serem utilizados como novas moléculas no tratamento da TB.

Com esta metodologia foi possível observar que embora alguns compostos apresentem bons valores de CIM, não são seguros para atuação em macrófagos e hepatócitos, ou que apesar de sua segurança, não possui atividade satisfatória contra o *Mtb*, como é o caso de oito em dez compostos. Nesta etapa foi possível observar que apenas os compostos A48 e A51 mostram-se verdadeiramente promissores, podendo o composto A48 ser utilizado até 11,9 vezes acima do seu CIM nos hepatócitos e 9,77 vezes nos macrófagos, enquanto o composto A51 poderia ser administrado em uma concentração 5,3 vezes maior que o CIM nos macrófagos e 8,82 vezes nos hepatócitos, mantendo ao menos 50% dessas células viáveis.

É sabido que o esquema terapêutico da TB consiste na administração de quatro fármacos simultaneamente, a fim de evitar o surgimento de resistência bacteriana. Mas para isso é preciso certificar-se que estes não apresentam efeitos antagônicos uns aos outros, anulando assim o seu mecanismo de ação. Nesse sentido, os compostos A48 e A51 apresentaram-se como indiferentes em junção aos fármacos rifampicina e etambutol, indicando sua possível utilização junto a estes medicamentos, sem apresentar qualquer interferência em seu mecanismo de ação.

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo e de alto custo, como defendido por LIMA *et al.* (2013), necessitando diversas etapas de estudo, que comprovem sua eficácia, bem como sua segurança, sendo os estudos *in vitro* aqui realizados, o primeiro passo na triagem de novas moléculas com potencial farmacológico, como candidatas ao tratamento da tuberculose. Os valores obtidos a partir desse estudo indicam o potencial que os derivados de triazol apresentam como possíveis agentes anti-TB e oferecem parâmetros para o seguimento de testes *in vitro* e realização de ensaios *in vivo*.



## 7. CONCLUSÃO

Os derivados de triazóis mostram-se como uma classe de compostos promissora, no que diz respeito ao seu potencial efeito contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível, a partir dos resultados obtidos neste estudo. Todos os dez compostos derivados de triazol testados apresentam atividade contra o *Mtb* e o composto A48, dentre todos, apresenta-se como mais efetivo contra a bactéria.

Os derivados de triazol apresentam moderada segurança em linhagens celulares de hepatócitos e macrófagos e, além disso, dois dos dez compostos analisados apresentam bons resultados em relação ao índice de seletividade, sendo o A48 e A51, mesmo estando abaixo do índice considerado ideal, porém indicando potencial promissor dessa classe.

Quanto ao índice de concentração inibitória fracionada, os compostos A48 e A51 se mostram como indiferentes para serem utilizados junto a fármacos de referência da tuberculose, como a rifampicina e o etambutol, indicando sua possível utilização junto a estes medicamentos. Portanto, os testes *in vitro* aqui realizados são o primeiro passo para demonstrar a eficácia e potencial promissor que estas moléculas apresentam contra a espécie *Mycobacterium tuberculosis*.

## REFERÊNCIAS

- ARBEX, M. A. *et al.* Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1: fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 626 – 640, 2010.
- BANU, K., DINALER, A., ANANTHNARAYAN, C. Synthesis and characterization of antimicrobial studies and pharmacological screening of some substituted 1,2,3-triazoles. **Indian J Pharm Sci.** v. 61, p. 202 – 205, 1999.
- BAÑULS, A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, nov 2015.
- BARCELOS A, *et al.* Tuberculose pulmonar e osteoarticular [Pulmonary and osteoarticular tuberculosis]. **Acta Reumatol Port.** v. 33, n. 1, p. 86 – 90, 2008.
- BARROS, L. P. C. *et al.* Anti-Mycobacterium tuberculosis activity of naphthoimidazoles combined with isoniazid and rifampicin. **Tuberculosis**, v. 111, p. 198 – 201, 2018.
- BERTOLAMI, M. C. *et al.* Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 85, n. 5, p. 25 – 27, 2005.
- BISAGLIA, J. B. *et al.* Atualização terapêutica em tuberculose: principais efeitos adversos dos fármacos. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 53 – 59, 2003.
- BOLETIM epidemiológico de Tuberculose. MS/CGDI, v. 1, mar 2021.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2019.
- BRITES, D.; GAGNEUX, S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and Homo sapiens. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 6 – 24, março 2015.

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660 – 663, 2013.

CHEN M., *et al.* Synthesis and anti-bacterial activity of some heterocyclic beta-enamino ester derivatives with 1,2,3-triazole. **Heterocyclic Comm.** v. 6, p. 421 – 426, 2000.

CHEVALIER, F. L. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* evolutionary pathogenesis and its putative impact on drug development. *Future Microbiology*, v. 9, n. 8, outubro 2014. ISSN 1746-0913.

COLES. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, p – 537 – 544, 1998.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

CRUZ-KNIGHT, W.; BLAKE-GUMBS, L. Tuberculosis: an overview. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 40, n. 3, p. 743 – 756, setembro 2013.

DICKINSON, J. M.; MITCHISON, D. A. Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampin in the chemotherapy of tuberculosis. **American Review of Respiratory Disease**, v. 123, n. 4, p. 367 – 371, 1981.

DIOGO, E. *et al.* Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of naphthoquinone- containing triazoles: electrochemical studies on the effects of the quinoidal moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 6337 – 6348, setembro 2013.

DUCATI, R. G. *et al.* The resumption of consumption – a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, nov 2006. ISSN 1678-8060.

DURAN A., DOGAN H., ROLLAS H.  
1,4-dihydro-3-(3-hydroxy-2-naphthyl)-4-substituted-5H-1,2,4-triazoline-5-thiones  
. **Il Farmaco**. v. 57, p. 559 – 564, 2002.

ENARSON, D.; MURRAY, J. Global epidemiology of tuberculosis. In: ROM, W. N.; GARAY, S. M. (ed.). **Tuberculosis**. Boston: Little, Brown and Company, 1996. p. 57 – 75.

FLOSS, HEINZ; YU, TIN-WEIN. Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, p. 621 – 632, 2005.

FOGEL, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. **Tuberculosis**, v. 95, n. 5, p. 527 – 531, 2015.

FONTANA, R. T. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 3, p.371 – 376.

FOX, W.; SUTHERLAND, I.; DANIELS, M. A five-year assessment of patients in a controlled trial of streptomycin in pulmonar tuberculosis. **Quartely Journal of Medicine**, v. 23, n. 91, p. 347 – 366, 1954.

FRAUD, S. *et al.* Effects of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and chlorhexidine diacetate on Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessos strains with modified permeability. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 575 – 584, 2003.

GOMES, A. P.; SIQUEIRA-BATISTA, R. **ANTIMICROBIANOS: GUIA PRÁTICO 2010/2011**. 2. Ed. [S.I]: Rubio, 2010.

GROSSET, J. Quoi de neuf sur la tuberculose en 1998? **Revue de Médecine Interne**, v. 19, n. 9, p. 613 – 616, 1998.

HEINRICHS, M. T. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37ra and H37rv have equivalent minimum inhibitory concentrations to most antituberculosis drugs. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 7, n. 2, p. 156 – 161, 2018.

HONG KONG CHEST SERVICE/BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Controlled trial of 6-month and 8-month regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis. First report. **American Review of Respiratory Disease**, v. 118, n. 2, p. 219 – 228, 1978.

HORSBURGH, R.; BARRY, C.; LANGE, C. Treatment of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 22, p. 2149 – 2160, 2015.

HUF, G.; KRITSKI, A. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 38, n. 2, 2012.

JOHNS, B *et al.* The use of oxadiazole and triazol substituted naphthvidines as HIV-1 integrase inhibitors. Part 1: Establishing the pharmacophore. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, n. 6, p. 1802 – 1806, 2009.

KATSUNO K. *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015.

KATRITZKY, A.; RACHWAL, S. Five-membered Rings: Triazoles, Oxadiazoles, Thiadiazoles and their Fused Carbocyclic Derivatives. In: KATRITZKY, A. *et al.* (ed.). **Comprehensive Heterocyclic Chemistry**. [S.l.: s.n.], 1997. cap. 5, p. 1 – 158.

KAYASHIMA, T. *et al.* 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 278, n. 1, p. 34 – 40, 2009.

MARSHALL, G. *et al.* Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis: a medical research council investigation. **British Medical Journal**, v. 2, p. 769 – 782, 1948.

MELO, J. *et al.* Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 569 – 579, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55 – 63, 1983.

MUJAHID, M. *et al.* Synthesis and antitubercular activity of amino alcohol fused spirochromone conjugates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 5, p. 1416 – 1419, 2013.

MUTHUKRISHNAN, M. *et al.* Syntheses and biological evaluation of new triazole-spirochromone conjugates as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 18, p. 2387 – 2389, 2011.

OLIVEIRA V., *et al.* Synthesis of alkynylated 1,2,4-oxadiazole/1,2,3-1H-triazole glycoconjugates: Discovering new compounds for use in chemotherapy against lung carcinoma and *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 220, 2021.

ORME, I. Tuberculosis Drug Screening Program. Busca de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose. **Antimicrobial agents and chemotherapy** , v. 45 n. 7, p. 1943–1946, 2001.

PALOMINO, J. *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2720 – 2722, 2002.

PETRINI, B.; HOFFNER, S. Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 2, p. 93 – 97, julho 1999.

RABAHI, M. F. *et al.* Tuberculosis treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 6, p. 472 – 486, 2017.

REDIER H. L. **Epidemiologic basis of tuberculosis control**. [S.l.]: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), 1999.

ROSEMBERG J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. v. 9, n. 1, 2001.

ROSSETTI, M. *et al.* Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 4, 2002.

ROSSMAN, M. D.; MACGREGOR, R. Introduction and brief history. **Philadelphia: McGraw-Hil**, 1995.

SÁ, L., *et al.* Tuberculose faringolaríngea. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 73, n. 6, p. 862 – 866, 2007.

SANCHES, C. O desafio de fazer pesquisa científica no Brasil, 2016. Disponível em:

<https://www.labnetwork.com.br/especiais/o-desafio-de-fazer-pesquisa-cientifica-no-brasil/#:~:text=Os%20principais%20problemas%20enfrentados%20pelos,se%20de%20dicar%20integralmente%20%C3%A0%20pesquisa>. Acesso em: 14/05/2021.

SANCHOTENE, K. *et al.* Comparative evaluation of the Nitrate Reductase Assay and the Resazurin Microtitre Assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first line anti-tuberculosis drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 16 – 20, 2008.

SARAVANAN, M. *et al.* Review on emergence of drug-resistant tuberculosis (MDR & XDR-TB) and its molecular diagnosis in Ethiopia. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 237 – 242, 2018.

SAVACOOOL, J. W. Philadelphia and the White Plague. **Trans Stud Coll Physicians Phila**, v. 8, n. 3, p. 81 – 147, setembro 1986.

SCHATZ, A.; BUGIE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 55, n. 1, p. 66 – 69, 1944.

SHEHZAD, A. *et al.* Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 74 – 81, 2013.

SHEREMENTE *et al.* Synthesis of 4-Aryl-5-nitro-1,2,3-triazoles. **Russ j Org Chem**. v. 40, p. 594 – 595, 2004.

SMITH *et al.* Anthranilic amide and imidazobenzothiadiazole compounds disrupt *Mycobacterium tuberculosis* membrane potential, v. 10, p. 934-945, 2019.

SOMOSKOVI, A.; SALFINGER, M. Nontuberculous mycobacteria in respiratory infections: advances in diagnosis and identification. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 34, n. 2, p. 271 – 291, junho 2014.

UNDERNER, M. *et al.* COVID-19, tuberculose et mortalité induite. **Revue Des Maladies Respiratoires**, 2020.

UPLEKAR, M. *et al.* WHO's new End TB Strategy. **The Lancet**, v. 385, n. 9979, p. 1799 – 1801, 2015.

WHO. Global tuberculosis report 2004. Geneva: World Health Organization. 2004.

WHO. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020.

ZHANG, S. *et al.* Triazole derivatives and their anti-tubercular activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 501 – 513, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 591 – 593, 1992.