

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**AVALIAÇÃO IN VITRO DE DERIVADOS 1,2-ALCANODIAMINA FRENTE AO
Mycobacterium tuberculosis SENSÍVEL E MULTIDROGA RESISTENTE**

JOÃO PAULO DE LUCENA LAET

RECIFE

2019

JOÃO PAULO DE LUCENA LAET

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DERIVADOS 1,2-ALCANODIAMINA FRENTE AO
Mycobacterium tuberculosis SENSÍVEL E MULTIDROGA RESISTENTE**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel
Coorientadora: Dra. Fábria Regina Nascimento Fernando Burgos

RECIFE

2019

JOÃO PAULO DE LUCENA LAET

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DERIVADOS 1,2-ALCANODIAMINA FRENTE AO
Mycobacterium tuberculosis SENSÍVEL E MULTIDROGA RESISTENTE**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Fábiana Regina Nascimento Fernando Burgos (*Titular*)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima (*Titular*)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Msc. Aline dos Santos Peixoto (*Titular*)
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz-PE

Msc. Romário Martins Araújo (*Suplente*)
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz-PE

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)

- L158a Laet, João Paulo de Lucena Laet
Avaliação in vitro de derivados 1,2-alcanodiamina frente ao mycobacterium tuberculosis sensível e multidroga resistente / João Paulo de Lucena Laet Laet. - 2019.
38 f.
- Orientador: Lilian Maria Lapa Montenegro Pimentel.
Coorientador: Fabia Regina Nascimento Fernando Burgos.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2021.
1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Novos compostos. 3. Fármacos. I. Pimentel, Lilian Maria Lapa Montenegro, orient. II. Burgos, Fabia Regina Nascimento Fernando, coorient. III. Título

Dedico esse trabalho
a minha avó Maria
José (*in memoriam*),
que sempre acreditou
no meu potencial e
que continua sendo
um exemplo de amor
e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Principalmente aos meus pais, Luciene e Eduardo Laet, por tudo que representam em minha vida, pelo apoio de sempre, dedicação, carinho, amor e orientações. Se cheguei aqui devo tudo a vocês.

Aos meus irmãos, Eduardo e Maria Eduarda Laet, por todas nossas conversas importantes ou não, pela preocupação de sempre comigo e pelo amor, carinho e risadas que fazem da nossa família ser única.

A minha tia Lúcia Lucena, que sempre esteve ao meu lado, por tudo que representa na minha vida e pelo carinho, amor e apoio.

À minha orientadora, Lílian Montenegro pela oportunidade dada a mim, por confiar no meu potencial e estar sempre presente oferecendo os ensinamentos necessários.

A chefe do departamento, Haiana Schindler pela oportunidade dada e por sempre estar à disposição para orientar.

À minha coorientadora, Fábيا Burgos por ser uma professora extraordinária, amiga e por ser uma das pessoas que mais me apoiaram na minha vida acadêmica.

Aos meus amigos que fiz durante a graduação, os quais desejo todo sucesso do mundo. Os quais não posso deixar de citar: Amanda, Camilla e Debora.

A Leonardo Linhares, que foi meu coorientador no Laboratório de Imunoepidemiologia e que sempre foi atencioso, explicando com calma e em todo momento dando orientações fundamentais, influenciando diretamente na minha formação.

A Aline Peixoto, que sempre esteve a disposição para tirar dúvidas, tendo um papel importante na minha formação e a todo o momento dando orientações necessárias.

Aos amigos de laboratório que se tornaram também de vida, Danyele, Luanna e Romário, por estarem sempre compartilhando experiências, ajudando um ao outro nas incertezas do dia a dia, e por todos os momentos de diversões que tivemos.

Aos demais integrantes do Laboratório de Imunoepidemiologia, pela rotina que vivemos no laboratório, pelas trocas de conhecimento e por todo o aprendizado fornecido que foram essenciais na minha formação profissional.

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

Aos órgãos de fomento CNPq e FACEPE, pelo apoio financeiro.

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

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) é o agente causador da tuberculose (TB), uma doença infectocontagiosa, considerada uma das mais mortais do mundo. A TB continua sendo grande problema de saúde pública mundial e até o momento não houve uma forma efetiva de erradicá-la. Uma grande mudança na trajetória da TB aconteceu com a introdução das primeiras drogas anti-TB e por consequência o surgimento de formas de resistência aos antimicobacterianos, a tuberculose multidroga resistente (MDR-TB) e a tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB). A partir disso, surge a necessidade de novos fármacos serem propostos no tratamento dessa doença. O presente estudo busca avaliar compostos derivados do tipo diamina, relacionados ao etambutol, frente ao Mtb sensível e MDR-TB. Dez compostos derivados da classe 1,2-alcano-diamina foram sintetizados e caracterizados estruturalmente pelos laboratórios de química farmacêutica da Universidade de Salamanca. Para os testes biológicos foi utilizada a cepa padrão de referência, H37Rv (ATCC 27294) classificada como cepa sensível a todas as drogas utilizadas no tratamento da TB e um isolado clínico com perfil de MDR ao Etambutol, cedido pelo Laboratório de Saúde Pública de Pernambuco. A avaliação da atividade dos compostos foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) em placas de 96 poços através do método de microdiluição colorimétrico. Para a realização da citotoxicidade (CC50) foi utilizado o teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) com a linhagem celular J774A.1. O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão da CIM e da CC50. Os dez compostos testados apresentaram uma CIM variando entre 4,0 a >64,0 μM para cepa H37Rv e MDR. Em relação a CC50, os compostos apresentaram uma faixa de concentração variando em 3,9 a 32,8 μM . O composto D15 exerceu a melhor atividade frente a cepa de referência (H37Rv) e a cepa MDR (MDR 1576), no teste de citotoxicidade o composto que apresentou melhor resultado foi o D10. Com relação ao índice de seletividade, os compostos A4 e A5 foram os que obtiveram os melhores resultados mesmo estando abaixo do índice ideal. Os compostos avaliados neste estudo demonstraram moderada atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis* e suportam a continuidade do estudo dos derivados 1,2-alcano-diamina.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Novos compostos; Fármacos

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) is the causative agent of tuberculosis (TB), an infectious-contagious disease, considered one of the deadliest in the world. TB remains a major global public health problem and so far, there has been no effective way to eradicate it. A major change in TB trajectory occurred with the introduction of the first anti-TB drugs and consequently the emergence of resistance forms to antimycobacteria, resistant multidrug tuberculosis (MDR-TB) and extensively resistant tuberculosis (XDR-TB). From this, the need arises for new drugs to be proposed in the treatment of this disease. The present study aims to evaluate diamine derivatives, related to ethambutol, against sensitive Mtb and MDR. Ten compounds derived from the class 1,2-alkanediamine were synthesized and characterized structurally by the pharmaceutical chemistry laboratories of the University of Salamanca and provided through international cooperation. For the biological tests, the standard reference strain H37Rv (ATCC 27294) was classified as a strain sensitive to all drugs used to treat TB and a clinical isolate of a patient affected by pulmonary tuberculosis with a MDR profile, provided by the Health Laboratory Public of Pernambuco. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determined the evaluation of compound activity in 96-well plates by the colorimetric microdilution method. For cytotoxicity (CC50) the MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was used with the J774A.1 cell line. The selectivity index (IS) was calculated by the ratio of MIC and CC50. The ten compounds tested had a MIC ranging from 4.0 to > 64.0 μM for strain H37Rv and MDR. With respect to CC50, the compounds had a concentration range ranging from 3.9 to 32.8 μM . Compound D15 exerted the best activity against the reference strain (H37Rv) and MDR strain (MDR 1576), however in the cytotoxicity test the compound that presented the best result was D10. Regarding the selectivity index, compounds A4 and A5 were the ones that obtained the best results even though they were below the ideal index. The compounds evaluated in this study showed moderate activity against Mtb and support the continuity of the study of 1,2-alkanediamine derivatives.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, New compounds, Drugs

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos do tipo 1,2-alcanodiamina sintetizados classificados em C e D....	25
Tabela 2 – Compostos do tipo 1,2-alcanodiamina sintetizados classificados em A..25
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos 1,2-alcanodiamina frente a cepa sensível (H37Rv) e isolado clínico MDR de <i>M. tuberculosis</i> (MDR 1576)28
Tabela 4 - Citotoxicidade (CC ₅₀) dos compostos frente a linhagem celular de camundongos J7741A.1.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	American Type Culture Collection
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMB	Etambutol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IS	Índice de Seletividade
INH	Isoniazida
KatG	Catalase-peroxidase
mRNA	RNA mensageiro
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	Complexo de Micobactérias
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Ácido para-aminosalicílico (PAS)
PBS	Tampão fosfato-salino
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
SM	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Resistente
TRM-TB	Teste Rápido Molecular da Tuberculose
tRNA	RNA transportador
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 Histórico da Tuberculose	13
2.2 Epidemiologia	15
2.3 Agente Etiológico.....	15
2.4 Transmissão	16
2.5 Tratamento	17
2.6 Regime Terapêutico.....	17
2.6.1 Isoniazida.....	17
2.6.2 Rifampicina	18
2.6.3 Pirazinamida	18
2.6.4 Etambutol.....	19
2.6.5 Estreptomicina	20
2.7 Novos Derivados.....	20
3. OBJETIVO	22
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 ANTIMICROBIANOS DE REFERÊNCIA	23
4.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS	23
4.3 TESTES IN VITRO	24
4.3.1 Microrganismo	24
4.3.2 Padronização do Inóculo de <i>Mtb</i>	24
4.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	25
4.3.4 Determinação da Citotoxicidade (CC ₅₀).....	25
5. RESULTADOS	27
5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	27
5.2 Citotoxicidade (CC ₅₀)	28
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) que afeta tipicamente os pulmões, mas pode atingir qualquer órgão do corpo, causando a tuberculose extrapulmonar. É uma doença grave e constitui um dos grandes problemas de saúde pública no mundo, tendo sido considerada uma emergência global pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos. Em 2017, foi estimado que 10,4 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose no mundo, 1,5 milhão dos pacientes foram a óbito e estimados 490.000 novos casos de tuberculose multidroga resistente (TB-MDR), com aproximadamente 190.000 mortes por resistência no mesmo ano (WHO, 2019).

A tuberculose, no Brasil é uma das principais causas de morbimortalidade, ocupando o 16º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos no mundo. O país notificou 72.788 novos casos de TB em 2018. Dos casos registrados não se tem dados ainda em relação aos óbitos de 2018, no entanto no ano de 2017, aproximadamente 4.530 indivíduos vieram a óbito.

O estado de Pernambuco registrou, em 2018, 5.026 novos casos, sendo o 4º estado do Brasil com maior taxa de incidência, em que o número de casos da doença aumentou de 4.599 para 5.026, entre 2015 e 2018 (BRASIL, 2019; SVS, 2018; WHO, 2019).

Os principais fatores atribuídos ao desafio global da tuberculose incluem: a incidência de cepas *M. tuberculosis* (*Mtb*) resistentes para as mais eficazes drogas anti-TB de primeira e segunda linhas, o crescimento populacional de co-infectados TB-HIV e indivíduos imunocomprometidos e imunossuprimidos (AHMAD; MOKADDAS, 2014).

O diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais para a eficácia dos programas públicos de controle da doença, os quais buscam curar os doentes e evitar a transmissão da doença. O tratamento inadequado ou a não-aderência pelo paciente, quer seja por abandono ou efeitos adversos da medicação, são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da resistência na tuberculose, e o tempo durante o qual a cadeia de transmissibilidade é mantida tem sido apontado como um dos principais fatores de perpetuação da doença (DUCATI et al., 2006; HUF et al, 2012).

A resistência aos fármacos antituberculose (anti-TB) e, em particular, a multirresistência (MDR-TB e XDR-TB) constitui uma ameaça grave ao controle da

tuberculose (WHO, 2019). Casos de MDR-TB e XDR-TB podem resultar tanto de infecções primárias com cepas drogas resistentes ou de tratamentos inadequados, produzindo taxas de mortalidade muito elevadas. Além disso, a ocorrência de interações droga-droga, exclui a coadministração de algumas drogas anti-TB com outras medicações usadas em doenças crônicas, tal como a AIDS (SHEHZAD et al., 2013). Portanto, é necessário e importante a busca de novas e eficientes drogas anti-TB, que possam ser utilizadas como estratégia de controle nessa grande endemia (WHO, 2019).

Novas drogas candidatas devem encurtar o tratamento padrão da tuberculose e serem suficientemente eficazes contra o TB-MDR. Embora vários compostos estejam atualmente em fases avançadas de ensaio clínico, durante os últimos 40 anos, apenas um composto foi introduzido no mercado para tratamento da tuberculose, focado na TB-MDR. Contudo, nos últimos anos, pesquisas científicas no desenvolvimento de novas drogas anti-TB 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).

A Esfingosina (SPH) é uma classe promissora como novo composto em potencial. Esfingosina-1-fosfato (S1P), a forma ativada do SPH, está envolvida em alguns processos biológicos, incluindo a mobilização do Ca^{2+} , o crescimento celular, diferenciação e motilidade. Tem sido relatado que o papel de SPH e outros componentes lipídicos em endossomas que contém o *Mtb* levam à ativação de lisossomos de células infectadas pelo bacilo. Estes achados podem dar suporte ao uso de esfingonálogos na configuração de regimes de droga eficazes no ataque de reservatório de *Mtb* humano, a TB latente, que afeta um terço da população do planeta (OLMO et al., 2009).

Do ponto de vista estrutural, SPH e DSPH contém como um arranjo funcional pseudo-simétrico, um fragmento aminoetanol (hidroxietilamina) presente em duplicata, embora separadas por uma ponte de etileno, na estrutura de um dos medicamentos de primeira linha anti-TB, o etambutol (EMB). Além disso, o EMB contém uma ponte central de etilenodiamina, o que é também necessário para a sua atividade antimicobacteriana. Estudos do mecanismo de ação do EMB revelaram a sua capacidade para interferir com a integridade da parede celular micobacteriana, através da inibição da biossíntese de arabinogalactano, embora outras vias possíveis também tenham sido propostas (OLMO et al., 2009).

Este estudo buscou avaliar a ação de um número selecionado de novos derivados da classe 1,2-alcanodiamina contra o *Mtb*, com o objetivo de descobrir potenciais novos agentes anti-TB.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Histórico da Tuberculose

A tuberculose pode ser considerada uma das patologias mais antigas do mundo, sendo descrita em diversos períodos da humanidade (DANIEL, 2006). A TB é conhecida como uma doença transmitida pelo ar que afeta principalmente os pulmões, apresentando uma sintomatologia que compreende um quadro clínico de febre e tosse (FOGEL, 2015). Evidências dessa doença são encontradas em tratados arqueológicos de épocas passadas (DANIEL, 2006), porém a maior informação que nos chega sobre as vítimas da tuberculose é relativa às camadas sociais mais altas (ROSEMBERG, 1999).

No Brasil, os primeiros casos de tuberculose são datados da Brasil Colônia em meados de 1.500 (MACIEL et al, 2012). É de conhecimento de todos que durante um processo de colonização, os colonos de países em processo de urbanização ou urbanizados, traziam consigo várias enfermidades, a maioria não endêmica das regiões dominadas, assim contaminando a população local (ROSEMBERG, 1999). Acredita-se que as interações entre jesuítas previamente infectados com o bacilo culminaram no adoecimento e morte de inúmeros nativos, que apresentavam quadro de febre e tosse (MACIEL, 2012).

Durante o Brasil império (1822 – 1889), a taxa de mortalidade por TB era de 1 a cada 150 habitantes. Pertinente a este problema, o setor público de saúde da época desenvolveu medidas de controle sanitário a fim de combater não apenas a TB, mas outras epidemias, como a varíola e febre amarela. No entanto, durante o século XIX, uma epidemia de tuberculose se expandiu pelo país, representando uma importante causa de mortalidade, afetando principalmente a porção carente da população, devido as considerações insalubres e precária de higiene (ROSERMBERG, 1999; MACIEL et al., 2012).

No início do século XX, o indivíduo que contraía a tuberculose passou a ser visto, como uma pessoa refinada, existindo então um ideal romântico ao redor dessa doença. Diversas personalidades da época faleceram de TB, destacando-se José de Alencar, Augusto do Anjos, Cruz e Sousa e Casemiro de Abreu. Como a história é resumida pela

história das classes dominantes, junto com esse ideal romântico, ocorreu o esquecimento de milhões de desvalidos que morreram pela tuberculose, tanto no passado como na modernidade, praticamente nenhuma notícia se tem relativamente aos seus sofrimentos e dramas (ROSEMBERG, 1999; PÔRTO, 2007; MACIEL et al., 2012).

Durante o século XX, com uma elevada taxa de mortalidade de tuberculose ocorreram diversos projetos de intervenção sanitária por médicos e instituições da época, com o intuito de combater essa enfermidade. No entanto, apenas com Oswaldo Cruz, que se tornou diretor geral de Saúde Pública, em associação com a reforma Carlos Chagas, que passou a existir um maior compromisso do estado brasileiro no combate à tuberculose, avançando em melhores formas de diagnóstico, prevenção e tratamento (MACIEL et al, 2012).

A vacinação de recém-nascidos com o Bacilo Calmette e Guérin (BCG) foi iniciada em 1917. Na década de 40, foi criada a Campanha Nacional Contra a Tuberculose, havendo envolvimento de órgãos públicos e instituições privadas, gerando um impacto positivo na época.

Com o surgimento de fármacos, houve uma maior eficácia no tratamento da tuberculose. Em 1944, o pesquisador Selman Waksman descobriu a estreptomicina, sendo utilizada no tratamento da TB. Com o surgimento de resistência ao tratamento, surgiu a necessidade de buscar novas drogas, a partir desse fato houve o desenvolvimento de outros fármacos anti-TB que são utilizados até hoje em dia, como a isoniziada, pirazinamida, etambutol e rifampicina, possibilitando uma diminuição expressiva na taxa de mortalidade (BERTOLLI FILHO, 2001; MACIEL et al., 2012).

No entanto, mesmo com advento de fármacos anti-TB o negligenciamento da TB continuou, desta forma em 2006 a OMS introduziu o plano STOP TB - A Estratégia "Stop TB" no qual definiu-se os passos que os programas nacionais de controle da TB e seus parceiros precisam seguir ativamente e tendo o apoio ativo de todos os interessados. Uma ação direcionada aos casos de tuberculose e de coinfeção entre bacilos da TB-MDR e HIV (WHO, 2017).

Logo em 2014, a OMS implementou o programa END TB, uma estratégia que aborda metas e planos para erradicar a epidemia de Tuberculose com um plano estratégico de 2016 a 2035. (DILIKOV; RAVIGLIONE; SCANO, 2015).

2.2 Epidemiologia

A tuberculose é considerada um problema global de saúde pública, no momento atual permanece como uma das dez maiores causas de doença e morte na população mundial.

No ano de 2017 foram detectados cerca de 10,4 milhões de novos casos no mundo, destes, 6,2 milhões eram homens (60%), 3,2 milhões mulheres (30%) e 1 milhão crianças (10%). Dos 10,4 milhões de casos, aproximadamente 1 milhão de indivíduos (10%) apresentavam coinfeção com o HIV. Cerca de 1,7 milhões de pessoas vieram a óbito por tuberculose. Estima-se que sete países (China, Filipinas, Paquistão, Índia, Indonésia, Nigéria e África do Sul) são responsáveis por 64% dos novos casos de TB (WHO, 2017). No entanto, segundo a OMS, apenas 6,3 milhões de casos foram devidamente registrados e reportados, o que indica um déficit de 4,1 milhões de casos não notificados (WHO, 2017).

No Brasil, em 2018, foram notificados 72.788 novos casos de TB, apresentando uma incidência de 40 casos para cada 100 mil habitantes. No ano de 2017, aproximadamente 4.530 indivíduos vieram a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2017).

O estado de Pernambuco notificou, no ano 2018, 5.026 novos casos de tuberculose, tendo o estado apresentado uma das maiores taxas de mortalidade por TB do país, com 4,5 casos por 100 mil habitantes, em que o número de casos da doença aumentou de 4.599 para 5.026, entre 2015 e 2018. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

2.3 Agente Etiológico

A tuberculose é uma doença causada pelas bactérias que compõem o complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*, deste complexo quando falamos em saúde pública o *M. tuberculosis* e *M. africanum* são os principais causadores de TB, no qual o *M. tuberculosis* é a espécie mais importante. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Esse complexo de micobactérias (MTC) é formado por bacilos finos e retos, que variam de tamanho de acordo com a espécie, alternando entre 1 a 10 µm de comprimento

e 0,2 e 0,6 µm de largura. São imóveis, aeróbios estritos e intracelular facultativo. Reproduzem-se de forma assexuada, por divisão binária. A tuberculose é uma bactéria de proliferação lenta, que não esporula e nem forma cápsula. Além disso, essas micobactérias são caracterizadas pela presença de uma elevada concentração de ácidos micólicos em sua parede celular, que conferem uma importante resistência a dessecação da parede por substâncias de caráter álcool-ácido, reagentes químicos e antibióticos. Devido a isso, durante as etapas de lavagem das colorações de Ziehl-Neelsen (ZN), a parede continua a reter o corante, mesmo após a ação de soluções de lavagem convencionais, caracterizando-os como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (SOMOSKOVI & SALFINGER, 2014).

2.4 Transmissão

O *M. tuberculosis* é transmitido por via aérea, por meio da tosse, fala ou espirro de um indivíduo com tuberculose pulmonar em fase ativa (bacilífero). Esses pacientes têm uma maior capacidade de transmissão da doença, comumente apresentando uma baciloscopia positiva em amostras de escarro. (TALBOT & RAFFA, 2015).

A TB acomete, prioritariamente, o pulmão, que também é a porta de entrada da maioria dos casos. As gotículas exaladas (gotículas de Pflüger), ao entrarem em contato com o ar, rapidamente se tornam secas e transformam-se em partículas menores (<5-10 µm de diâmetro). Essas partículas menores, conhecidas como Núcleos de Wells (CAMPOS, 2006), contém um a dois bacilos, podendo manter-se em suspensão no ar por muitas horas e são capazes de alcançar os alvéolos, nos quais podem se multiplicar e provocar a chamada primo-infecção (RIEDER, et al, 1999).

A probabilidade de uma pessoa ser infectada depende de fatores exógenos e endógenos, como as barreiras naturais do organismo (cílios nasais, depuração mucociliar, tosse) que podem impedir que ocorra a infecção. Entre eles, pode-se citar a infectividade, a duração do contato e o tipo de ambiente compartilhado. Os pacientes com exame bacteriológico de escarro positivo sustentam a cadeia de transmissão da doença. Estima-se que uma pessoa com baciloscopia positiva infecte de 10 a 15 pessoas em média, em uma comunidade, durante um ano (TALBOT & RAFFA, 2015).

Um dos principais fatores do desenvolvimento da TB é o sistema imune do indivíduo. Assim, indivíduos com alguma imunodepressão, ou infectados com o vírus HIV, possuem uma maior predisposição a desenvolver a forma ativa da tuberculose, o que

torna a coinfeção dessas doença prosensa a letalidade (CAMPOS, 2006; TALBOT, RAFFA, 2015)

2.5 Tratamento

A tuberculose é uma doença curável, mas enfrenta uma problemática no tratamento devido a uma alta taxa de abandono (ARAKAWA, 2012). Atualmente o tratamento da tuberculose é conduzido por um esquema terapêutico com duração de seis meses, composto por quatro drogas de doses diárias: isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB), fornecidas pelo Programa Nacional de Controle de Tuberculose (PNCT) e disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS). O tratamento consiste em duas fases: a intensiva, que dura dois meses, composta pelos quatro antibióticos; e a fase de manutenção, com propósito de impedir a recidiva do bacilo, mantendo à administração de RMP e INH por mais quatro meses. Além disto, 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 droga estreptomicina (SM) (BRASIL, 2019).

2.6 Regime Terapêutico

2.6.1 Isoniazida (INH)

Quimicamente conhecida como hidrazida ou ácido isonitrico, foi descoberta em 1952 e é um dos principais medicamentos utilizados no tratamento, sendo o mais antigo fármaco sintético efetivo contra TB. A Isoniazida possui uma concentração inibitoria mínima (CIM) baixa, contribuindo assim para sua eficiência (ROSSETTI, et al., 2002).

A INH é um pró-fármaco (não ativo) que entra nos bacilos por difusão passiva e requer ativação para causar efeito. A forma tóxica é ativada dentro do bacilo pela enzima catalase-peroxidase (KatG), codificada pelo gene *katG* (ZHANG et al., 1992). O mecanismo de ação da INH, bem como os meios de resistência ao fármaco desenvolvidos pelo bacilo, é complexo e pouco entendido. Evidências sugerem que esse fármaco inibe a biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular, tornando a bactéria suscetível aos radicais de oxigênio e a outros fatores do meio (ROSSETTI, et al., 2002).

Apesar da INH ser um fármaco importante na administração da tuberculose, são observados alguns efeitos adversos, como: neuropatia periférica, dano hepático assintomático e até mesmo a falência do órgão (BISAGLIA, et al., 2003).

2.6.2 Rifampicina (RMP)

Quimicamente conhecida como 3-((4-metil-1-piperazinil) iminometil, foi descoberta em 1957 a partir da bactéria *Amycolatopsis mediterranei* (GROSSET, et al., 1998) e isolado pela primeira vez em 1959 (SENSI, et al., 1983). É um dos fármacos anti-TB mais eficazes e, junto com a INH, constitui a base do regime de tratamento da tuberculose. É um fármaco eficaz contra o bacilo metabolicamente ativo e contra o bacilo latente persistente e sua principal característica é a capacidade de esterilizar lesões de TB (DICKINSON; MITCHISON, 1981).

A RMP é um derivado semissintético e sua eficiência com CIM contra *M. tuberculosis* é baixa, assim como a INH, contribuindo para o seu êxito no tratamento (ROSSETTI, et al., 2002).

O mecanismo de ação da RMP é baseado na fase de crescimento da micobactéria, onde o fármaco acopla-se à RNA polimerase, bloqueando assim a síntese de RNA mensageiro, responsável pela produção de proteínas essenciais para a informação genética da bactéria, o DNA (FLOSS & YU, 2005). Apesar da RMP ser um fármaco relevante, alguns efeitos adversos: reações cutâneas, intolerância gastrointestinal, síndrome hematológica e coloração laranja dos fluídos do corpo (SIQUEIRA & GOMES, 2010).

2.6.3 Pirazinamida (PZA)

Quimicamente conhecida como pirazina-2-carboxamida, é um análogo da nicotinamida que desempenha um papel importante na redução do período de tratamento passando de 9 a 12 meses para 6 meses. (FOX; ELLARD; MITCHISON, 1999). Foi descoberta em 1936, porém foi empregada no tratamento apenas em 1970 (FRIEDEN & DRIVER, 2003).

De maneira similar à isoniazida, a pirazinamida também é um pró-fármaco que deve ser ativado para exercer seu efeito (ZHANG et al., 2003). Uma característica do mecanismo de ação desse fármaco é a eficácia única de eliminar uma população de bacilos dormentes e persistentes em meio ácido, como em sítios inflamatórios

granulomatosos e dentro do fagossoma de macrófagos infectados, na qual outras drogas não conseguem exercer atividade. Logo, em combinação com outras drogas, a PZA permite a redução do tempo de tratamento (ZHANG et al., 2014).

Mesmo a PZA sendo um fármaco importante para o tratamento, alguns efeitos adversos são preocupantes: dores nas juntas, vômitos, perda de apetite, mal-estar geral, anemia não originada da falta de ferro, urticária, efeitos tóxicos do fígado (BISAGLIA, et al., 2003).

2.6.4 Etambutol (EMB)

Conhecido quimicamente: dextro-etilenodiimino-di-1-butanol-dihidroclorid, é um agente bacteriostático contra bacilos metabolicamente ativos. É usado com outras drogas do regime terapêutico para evitar o surgimento de resistência ou para limitar a extensão de uma possível resistência existente. (ROSSETTI, et al., 2002). O EMB foi sintetizado em 1960, porém apenas em 1968 começou a ser empregado (DE SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

O EMB substituiu o ácido para-aminosalicílico (PAS) e a estreptomicina (SM) por ser muito mais tolerado e mais ativo; além de apresentar ação contra cepas resistentes à INH e à SM (AHMAD; MAKAYA; GROSSET, 2011).

Um aspecto da ação do EMB, é a sua atividade bacteriostática. O mecanismo de ação não está totalmente caracterizado, mas sabe-se que ele está associado com a inibição da síntese de um ou mais metabólitos, levando a danos ao metabolismo celular, parada da multiplicação e morte celular. É ativo apenas quando a célula estiver em divisão (SOINI & MUSSER, 2001).

As evidências sugerem que esta ação antimicobacteriana é devido à inibição de arabinofuranosil transferases, enzimas diretamente envolvidas na biossíntese da parede celular (MIKUSOVÁ et al., 1995).

Uma das dificuldades durante o período de uso do EMB é a sua possibilidade de gerar neurite retrobulbar e neurite periférica. A neurite retrobulbar tem como característica a baixa acuidade visual, visão turva, a constrição do campo visual e anormalidades na percepção de cor. gravidade dependerá da dose e da duração do regime e, em muitos casos, é reversível (BISAGLIA, et al., 2003).

2.6.5 Estreptomicina (SM)

Foi o primeiro fármaco utilizado no tratamento da tuberculose, descoberto em 1944 por Waksman e colaboradores, que isolaram a SM a partir de um actinomicete (*Streptomycetes griseus*) (GUIMARÃES et al, 2006).

A SM é um antibiótico aminociclitol glicosídico que inibe a tradução do RNA mensageiro (mRNA), afetando também a acurácia transducional. O mecanismo de ação desse aminoglicosídeo foi um tema de grande interesse. O principal alvo desse fármaco é a síntese proteica para a ação antibacteriana da estreptomicina. Em que, a estreptomicina exerce a sua ação antibacteriana graças a uma ligação à subunidade 30S do ribossomo. A partir disso, estudos forneceram evidências do papel ativo dessa subunidade na síntese de proteínas, com a importante descoberta de que a estreptomicina era capaz de induzir erros na tradução da mensagem codificada no mRNA. A SM tem como efeitos colaterais: toxicidade nos ouvidos, perda de audição, tontura, náusea, vômito e urticária (TAVARES, et al., 1996; ROSSETTI, et al., 2002; ARYA, 2007).

2.7 Novos Derivados

A diidroesfingosina, ou (2S,3R)-2-aminooctadecano-1,3-diol) é o componente básico do anabolismo de esfingolipídios e ceramidas em mamíferos e consiste de uma molécula com comprimento de cadeia de 18 átomos de carbono (PRUETT et al., 2008). Essa categoria de cadeia longa engloba centenas de compostos designados como “bases esfingóides”, que possuem variações estruturais em: comprimento da cadeia; número, posição e estereoquímica de ligações duplas; grupos hidroxilas e outras funcionalidades. Estes compostos são encontrados em mamíferos, fungos, plantas, insetos, parasitas e organismo aquáticos e até então, eram considerados apenas como componentes estruturais das membranas celulares eucarióticas (MCQUISTON; HALLER; DEL POETA, 2006).

A esfinganina é uma das principais bases esfingóides encontradas em diversos organismos sendo o intermediário na biossíntese de novo da esfingosina, através da dessaturação de diidroceramidas para produzir ceramidas e, consecutivamente, a esfingosina. Por sua vez, a esfingosina, bem como seus derivados, detém funções biológicas cruciais na sinalização celular, como: a regulação da proliferação celular, a resposta oxidativa, a interrupção do ciclo celular, a diferenciação, apoptose, inflamação e resposta imune (MCQUISTON; HALLER; POETA, 2006; ZHENG et al., 2006).

A forma ativada da esfingosina (esfingosina 1-fostato ou S1P), é um dos lipídios sinalizadores mais estudados atualmente (LYNCH; MACDONALD, 2008). Uma das observações é que a S1P é uma molécula proeminente no trânsito linfocitário e que utilizar medicamentos que imitem essa sinalização poderia modular o sistema imunológico e assim, obter um efeito terapêutico considerável (MANDALA et al., 2002).

Por estas moléculas fazerem parte, juntamente com o colesterol, de microdomínios na estrutura de membrana celular (raft lipídicos) não é surpreendente que muito microorganismos intracelulares utilizem esfingolipídios durante o curso da infecção. (SCHMITZ; GRANDL, 2008). Os rafts de membrana atuam ao mediar a internalização de bactérias, vírus e parasitas nas células do hospedeiro e, desse modo, iniciam uma cascata de reações para promover apoptose e liberação de sinalizadores. Ultimamente, há um aumento no interesse nestas moléculas, bem como enzimas metabolizadoras de esfingolipídios como mediadoras da patogênica microbiana e, por conseguinte, potencial alvo no desenvolvimento de novas terapias (MCQUISTON; HALLER; DEL POETA, 2006).

As bases esfingóides apresentam uma considerável diversidade estrutural e a descoberta de moléculas semelhante a estas (alguns que ocorrem naturalmente e outros análogos sintetizados) são promissores compostos “leads” no desenvolvimento de novos medicamentos, enquanto outros causam doenças (PRUETT et al., 2008).

Compostos análogos a esfinganina apresentaram alta potência frente a cepas sensível e multidroga resistente de *Mtb*, *in vitro* e em camundongos infectados (DEL OLMO et al., 2009; OLMO et al., 2016). Além disso, esses análogos apresentaram atividade anti-inflamatória e analgésica em modelos *in vivo* (DE CAMPOS BUZZI et al., 2010).

3 OBJETIVO

Avaliar novos compostos contra o *Mycobacterium tuberculosis* resistente como candidatos a nova droga de uso clínico para o tratamento da tuberculose multidroga resistente.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o potencial antimicobacteriano *in vitro* dos compostos sintetizados frente a cepa sensível de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) e isolado clínico multidroga resistentes
- Avaliar a ação citotóxica *in vitro* dos compostos sintéticos em linhagem celular macrófaga
- Avaliar o desempenho dos compostos sintéticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANTIMICROBIANOS DE REFERÊNCIA

As drogas de primeira linha RMP e EMB (Sigma-Aldrich), foram utilizadas como controle positivo de atividade da concentração inibitória mínima. As drogas foram pesadas em balança analítica (CELTAC – FA2104n – 210 x 0,0001g), solubilizadas em solvente H₂O para EMB e Metanol para RMP, posteriormente esterilizadas por filtro de poro (Millex – Merck Millipore) até o uso imediato nos experimentos.

4.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Foram sintetizados, analisados e caracterizados estruturalmente pelos Laboratórios do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca – USAL, sob a coordenação dos professores Dr. Arturo San Feliciano e Dra. Esther del Olmo e fornecidos ao Laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de imunologia do IAM/Fiocruz, através de cooperação internacional já oficialmente estabelecidas. Foram avaliados um total de dez compostos derivados da classe 1,2-alcano-diamina.

As condições de reação e os processos químicos foram previamente estabelecidos e publicados na literatura científica (LUCAS et al., 2000, DEL OLMO et al., 2009; DE CAMPOS BUZZI et al., 2010).

Inicialmente foram sintetizados oito compostos com esqueletos de base do 1,2-alcandiamina, como mostrado na Tabela 1. Esses compostos foram sintetizados com objetivo de otimizar o tamanho da cadeia (R) em ambas as séries, encurtando ou alongando-a. Logo estes compostos estão identificados pela letra “C” e “D” na tabela 1.

Na segunda fase, foram sintetizados dois novos compostos, mantendo as funcionalidades mais ativas anti-TB, incorporando um fragmento benzênico na cadeia. Estes compostos estão identificados pela letra A na tabela 2. Para este estudo foram sintetizados um total de 10 compostos (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: Compostos do tipo 1,2-alcanodiamina sintetizados classificados em C e D

Amostra	Código USAL	Fórmula	Peso Molecular
D10	AA-002906	C ₁₃ H ₂₈ N ₂ O ₂	244
D11	AA-002908	C ₁₅ H ₃₂ N ₂ O ₂	272
D12	AA-002912	C ₁₉ H ₄₀ N ₂ O ₂	328
D13	AA-022908	C ₁₇ H ₃₆ N ₂ O ₂	300
D14	AA-022910	C ₁₉ H ₄₀ N ₂ O ₂	328
D15	AA-022918	C ₂₇ H ₅₆ N ₂ O ₂	440
C5	AA-002914	C ₂₁ H ₄₄ N ₂ O ₂	356
C6	AA-400014	C ₂₀ H ₄₄ N ₂	312

Fonte: o autor.

Tabela 2: Compostos do tipo 1,2-alcanodiamina sintetizados classificados em A

Amostra	Código USAL	Fórmula	Peso Molecular
A4	AA-032914	C ₂₅ H ₅₂ N ₂ O ₂	412
A5	AA-042914	C ₂₇ H ₅₆ N ₂ O ₂	440

Fonte: o autor.

4.3 TESTES *IN VITRO*

4.3.1 Microrganismo

O *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foi utilizado como cepa de referência da American Type Culture Collection, classificada como cepa sensível a todas as drogas utilizadas no tratamento da TB. Neste estudo foi utilizado um isolado clínico de paciente acometido por *Mycobacterium tubeculosis* com perfil de resistência a Etambutol e Rifampicina (TB-MDR), caracterizado e cedido pelo Laboratório de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN).

4.3.2 Padronização do Inóculo de *Mtb*

As cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) e isolado clínico TB-MDR, foram semeadas e cultivadas 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: ácido oléico 10%, 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 em vórtex por 2 minutos e mantidos em

repouso vertical por 15 minutos para permitir a sedimentação de grumos e aerossóis. Em seguida, o pellet foi ajustado com a turbidez 1 da escala MacFarland com uma diluição posterior de 1:20 (v:v) em caldo Middlebrook 7H9 suplementado.

4.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da atividade dos compostos sintetizados e drogas de referência foram realizadas pelo método colorimétrico de microdiluição em placas de 96 poços, descrito por Palomino et al. (2002).

Foram adicionados 200 µL de água destilada nos poços do perímetro externo da microplaca com o propósito de evitar a evaporação do sistema de meio de cultura mais compostos - devido ao longo período de incubação. Foi depositado no restante dos poços 100 µL de caldo 7H9 suplementado. Diluições seriadas de 1:2 dos compostos foram realizadas diretamente na microplaca, com concentração variando de 64 µM a 2 µM. Poços de controle positivo e controle negativo de crescimento foram incluídos para todas as cepas testadas. 100 µL do inóculo ajustado, foi adicionado em todos os poços – exceto os poços de controle de esterilidade. As placas foram envolvidas em plástico e incubadas a 37°C em atmosfera normal por 7 dias.

Após o período de incubação, 30 µL de uma solução estéril de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% foi adicionada em todos os poços e reincubada *overnight*, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. A CIM foi definida como a menor concentração da droga que preveniu a mudança de coloração de azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido). Os “pontos-de-corte” (*cutoff*) para definir susceptibilidade/resistência das cepas frente aos antimicobacterianos padrão foram: 0.5 e 5 µg/ml para RMP e EMB, respectivamente. (SANCHOTENE et al., 2008)

4.3.4 Determinação da Citotoxicidade (CC₅₀)

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). Foi utilizado a linhagem celular J774A.1 (ATCC TIB-67), correspondente à macrófagos murino, cultivada em meio RPMI (Lifetechnology) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen), sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L). O cultivo foi incubado a 37°C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular.

As células J774A.1 foram retiradas por raspagem utilizando *scraper* e foi utilizada uma concentração de 1 x 10⁵ células/mL, ajustadas com auxílio da câmara de Neubauer.

As células foram semeadas em microplaca de 96 poços e incubadas por 24h nas mesmas condições iniciais de cultivo para permitir a adesão celular. Os compostos foram submetidos a diluição seriada em meio RPMI e estas soluções foram transferidas para a placa contendo as células e incubadas por 48h. Após este período, o meio foi retirado e adicionado 25 µL de MTT solubilizado em PBS (5mg/mL). A placa foi reincubada por 2h nas mesmas condições de ambiente e temperatura. Após esse período o meio foi aspirado, e 100 µL de DMSO foi adicionado para dissolução dos cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi medida através do filtro de 570nm em leitor de placas.

O valor de CC_{50} foi definido como a maior concentração do composto em que 50% das células permaneceram viáveis e estimado por análise de regressão logarítmica dos valores encontrados, no software SPSS 8.0.

Foram considerados como compostos promissores, e selecionados para as etapas seguintes de avaliação, aqueles que apresentaram o índice de seletividade (IS) ≥ 10 , conforme a equação 1.

O índice de seletividade (IS) é a relação entre citotoxicidade dos compostos frente a macrófagos e sua atividade *in vitro* contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Valores de IS ≥ 10 indicam que o composto foi mais tóxico para a bactéria em relação à célula hospedeira. Valores de IS ≤ 10 demonstram toxicidade do composto para macrófagos (DON & IOSET, 2014).

$$SI = \frac{CC50}{CIM} \quad (1)$$

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os compostos sintetizados do tipo 1,2-alcanodiamina (AA) (tabela 3), exerceram efeito contra a cepa sensível e MDR de *M. tuberculosis*. As concentrações inibitórias variaram em 4 a >64 μM para a cepa H37Rv e 4 a >64 μM para a cepa MDR.

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos 1,2-alcanodiamina frente a cepa sensível (H37Rv) e isolado clínico MDR de *M. tuberculosis* (MDR 1576).

Compostos Teste	CIM (μM)			
	H37Rv	PE	MDR 1576	PEr
AA-00/29/06 (D10)	>64	>0,08	>64	>0,6
AA-00/29/06 (D11)	>64	>0,08	>64	>0,6
AA-00/29/06 (D12)	32	0.15	32	1,2
AA-00/29/06 (D13)	64	0,08	>64	>0,6
AA-00/29/06 (D14)	64	0,08	>64	>0,6
AA-00/29/06 (D15)	4	1,23	4	9,8
AA 00/29/14 (C5)	17.6	0,4	17.6	3.3
AA 40/00/14 (C6)	32	0,2	40	1,4
AA 03/29/14 (A4)	8	0,9	21	2,6
AA 04/29/14 (A5)	8	0,9	20	2,6
EMB	7.21	1	57.7	1
RMP	0.08	90	> 2.4	< 24

Fonte: Elaborada pelo autor

Os derivados D10, D11, D13 e D14 apresentaram uma CIM relativa de 64 a >64 μM para cepa sensível (H37Rv) e isolado clínico de TB-MDR (MDR 1576).

Os derivados D12 e C6 apresentaram uma CIM relativa a 32 μM para cepa H37Rv, no entanto para cepa de isolado clínico de TB-MDR o composto D12 obteve uma CIM relativa a 32 μM enquanto o C6 apresentou uma CIM de 40 μM .

O derivado C5, obteve uma CIM relativa a 17,6 μM para a cepa sensível (H37Rv) e de isolado clínico de MDR-TB (MDR 1576).

Os derivados A4 e A5, apresentaram uma CIM relativa a 8 μM para cepa H37Rv, no entanto para cepa de isolado clínico de TB-MDR o composto A4 e A5 obteve uma CIM relativa a 21 e 20 μM , respectivamente.

Por outro lado, o derivado D15, obteve uma CIM relativa a 4 μM para a cepa sensível (H37Rv) e de isolado clínico de MDR-TB (MDR 1576).

5.2 Citotoxicidade (CC_{50})

Em relação à citotoxicidade, analisando a tabela 4, os compostos foram classificados com uma citotoxicidade moderada.

Tabela 4: Citotoxicidade (CC_{50}) dos compostos frente a linhagem celular de camundongos J7741A.1

Compostos Teste	CC50 (μM)	SI
	J774A.1	
AA-00/29/06 (D10)	32.8	0.5
AA-00/29/08 (D11)	20.2	0.3
AA-00/29/12 (D12)	6.2	0.2
AA-02/29/08 (D13)	3.9	0.1
AA-02/29/10 (D14)	20.1	0.3
AA-02/29/18 (D15)	4.7	1.2
AA 00/29/14 (C5)	5.1	0.8
AA 40/00/14 (C6)	25.6	0.8
AA 03/29/14 (A4)	21.1	2.64
AA 04/29/14 (A5)	20.7	2.60
EMB	> 1220	169.2
RMP	> 3610	45125.0

Fonte: elaborada pelo autor

Os compostos apresentam uma CC_{50} variando de 3.92 a 32.8 μM , o composto D10 apresentou a melhor concentração de citotoxicidade para testes *in vitro*.

No entanto, outros compostos como o C6, A4, A5, D14 e D11 apresentaram resultados considerados satisfatórios, com uma CC_{50} variando de 20,1 a 25,6 μM .

Apesar disso, alguns compostos não tiveram resultados promissores como; C5, D15, D13 e D12 com uma CC_{50} variando de 3,9 a 6,2 μM .

Com relação ao índice de seletividade, devido ao resultado ser a razão da CIM pela CC_{50} , alguns compostos ficaram bem inferior do índice ideal.

Os compostos que obtiveram os melhores resultados mesmo estando abaixo do ideal do Índice de Seletividade (SI) foram o A4 e A5, com um SI de 2,64 e 2,60, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

Segundo LIMA et al., (2013), o processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (P&D) é complexo, longo e de alto custo. O impacto do uso de medicamentos na sociedade tem várias particularidades. Por um lado, os fármacos podem aumentar a expectativa de vida das pessoas, tratar certas doenças, trazendo assim melhores benefícios socioeconômicos; por outro lado, podem aumentar os custos da atenção à saúde se utilizados de forma inadequada. Por isso a introdução de um novo medicamento no regime terapêutico é um processo longo e bastante oneroso, em todo o processo de P&D geralmente dura doze anos, com probabilidade de sucesso muito pequena.

Conforme defendido por ROGERO et al., (2000), os ensaios *in vitro* são os primeiros testes para avaliar a compatibilidade de qualquer composto para uso e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da compatibilidade do composto pode ter continuidade, realizando os ensaios necessários em modelos de animais de laboratório.

O uso abusivo e indiscriminado de antimicobacterianos tem proporcionado o surgimento de resistência das micobactérias aos fármacos de uso corrente, como consequência, surge a necessidade de se pesquisar novos compostos que possam substituir aqueles que já não têm tanta eficácia (MASURANI & TAVARES, 2007).

Atualmente, o tratamento da TB-MDR enfrenta um grande problema, no qual os fármacos atuais não são tão eficientes com uma taxa global de resultados positivos do tratamento da TB-MDR sendo apenas de 54%, ou muito menos efetivo quando a resistência aos fármacos vai além do TB-MDR indo para a TB-XDR (MIGLIORI et al, 2013).

De maneira que o tratamento da TB-MDR continua sendo uma tarefa difícil, principalmente em razão da alta incidência de diversos efeitos, devido ao longo tempo de tratamento, do alto custo dos esquemas utilizados e do esgotamento dos recursos de saúde, principalmente em países em desenvolvimento, como Brasil. Sendo assim, mostra-se a necessidade da introdução de novos fármacos ao regime terapêutico (FALZON et al., 2017).

Assim, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos visando melhorar os resultados do tratamento da TB-MDR e TB-XDR, no que se refere a novos fármacos ou repropostas de outros fármacos (CAMINERO et al, 2017).

Dessa forma, o presente estudo avaliou o desempenho de compostos derivados do 1,2-alcanodiamina como novas drogas de uso clínico para o tratamento da TB-MDR.

Os derivados do 1,2-alcanodiamina testados, como mostrado na tabela 3, apresentaram uma moderada atividade antimicobacteriana *in vitro*, com valores de CIM similar para cepa sensível e MDR. O composto D15 apresentou o melhor resultado para as cepas H37Rv e MDR 1576, sendo 1,23 vezes mais potente que o EMB para cepa sensível e 9,8 vezes para cepa MDR.

No entanto, os compostos A4, A5, C5, C6 e D12 não demonstraram boa atividade para cepa sensível (H37Rv), apesar disso para a cepa de isolado clínico de MDR (MDR 1576) apresentaram resultados superiores à droga de referência, variando de 1.2 a 3.3 vezes mais potente que o EMB.

Todavia, os compostos D10, D11, D13 e D14 não demonstram boa atividade para cepa sensível e cepa de isolado clínico.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade, como mostrado na tabela 4, os compostos apresentaram resultados que variaram de 3.9 a 32.8 μM , em que o composto D10 apresentou o melhor resultado (32.8 μM).

No entanto, os derivados C6 e A4 obtiveram bons resultados, de 25.6 e 21.4 μM , respectivamente, sendo o segundo e terceiro melhores resultados para citotoxicidade. Outros compostos, como A5 e D11, do mesmo modo que os anteriores, conseguiram bons resultados de 20.7 e 20.2 μM .

A partir desses resultados, foi possível calcular o Índice de Seletividade (tabela 4), utilizando a razão da CIM pela CC_{50} . Os compostos A4 e A5 alcançaram os melhores resultados de 2,60 e 2,64 respectivamente.

Segundo Cantrell e colaboradores (2001), compostos que apresentaram CIM menor que 64 são considerados prósperos, logo, os compostos A4, A5, C5, C6 e D12 podem também ser considerados satisfatórios, principalmente contra cepas MDR.

De acordo com Gu e colaboradores (2004), uma CIM menor 128 indica uma substância ativa contra *Mtb*, porém não o suficiente para substituir um fármaco do regime atual.

Diante disso, podemos estabelecer que os compostos são ativos contra o *Mtb*, de maneira que quanto menor o valor de CIM mais ativa é a substância; compreendemos, assim, o potencial dessa classe de derivados para obtenção de novos protótipos antimicobacterianos contra a TB-MDR.

7 CONCLUSÃO

- Dentre os dez compostos testados, o D15 apresentou significativo efeito em ensaios de concentração inibitória mínima, demonstrando atividade antimicobacteriana tanto para cepa sensível quanto para de isolado clínico TB-MDR, obtendo resultados melhores que a droga de referência Etambutol.
- O conjunto de resultados obtidos neste trabalho revelam que os compostos D10, C6, A4 e A5 apresentam citotoxicidade moderada, no qual os outros compostos não apresentam citotoxicidade significativa em macrófagos de linhagem J774.A1.
- Em relação ao Índice de Seletividade, os compostos A4 e A5 foram os mais promissores, mesmo estando abaixo do índice ideal, confirmando assim, o efeito antimicobacteriano dos derivados 1,2-alcanodiamina contra o *Mtb*, demonstrando o potencial dessa classe.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Suhail; MOKADDAS, Eiman. Current status and future trends in the diagnosis and treatment of drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. **Journal of infection and public health**, v. 7, n. 2, p. 75-91, 2014.

AHMAD, Zahoor; MAKAYA, Nusrat Habib; GROSSET, Jacques. History of drug discovery: Early evaluation studies and lessons learnt from them. In: **Antituberculosis chemotherapy**. Karger Publishers, 2011. p. 2-9.

ARAKAWA, Tiemi et al. Acessibilidade ao tratamento de tuberculose: avaliação de desempenho de serviços de saúde. **Rev Latino-Am Enferm**, v. 19, n. 4, p. 1-9, 2011.

ARYA, Dev P. **Aminoglycoside antibiotics: from chemical biology to drug discovery**. John Wiley & Sons, 2007.

BERTOLLI FILHO, Claudio. **História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950**. Editora Fiocruz, 2001.

BISAGLIA, Joana Buarque et al. Atualização terapêutica em tuberculose: principais efeitos adversos dos fármacos. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 11, n. 2, p. 53-59, 2003. CAMINERO, Jose A. et al. Proposal for a standardised treatment regimen to manage pre-and extensively drug-resistant tuberculosis cases. 2017.

CAMPOS, Hisbello S. et al. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2006.

CANTRELL, Charles L.; FRANZBLAU, Scott G.; FISCHER, Nikolaus H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta medica**, v. 67, n. 08, p. 685-694, 2001.

DANIEL, Thomas M. The history of tuberculosis. **Respiratory medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862-1870, 2006.

DE ANDRADE, LAERTE MANHÃES et al. Ação da pirazinamida e do etambutol sobre a população bacteriana eliminada por pacientes com tuberculose pulmonar tratada com esquema de curta duração. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 10, n. 3, p. 139, 1984

DE CAMPOS BUZZI, Fátima et al. New antinociceptive agents related to dihydrosphingosine. **Pharmacological reports**, v. 62, n. 5, p. 849-857, 2010.

DE SOUZA, Marcus Vinícius Nora; VASCONCELOS, Thatyana Rocha Alves. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 678, 2005.

DEL OLMO, Esther et al. Efficacious In Vitro and In Vivo Effects of Dihydrospingosine–Ethambutol Analogues Against Susceptible and Multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Archives of medical research*, v. 47, n. 4, p. 262-270, 2016.

DIRLIKOV, Emilio; RAVIGLIONE, Mario; SCANO, Fabio. Global tuberculosis control: toward the 2015 targets and beyond. *Annals of internal medicine*, v. 163, n. 1, p. 52-58, 2015.

DON, R. O. B.; IOSET, Jean-Robert. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*, v. 141, n. 1, p. 140-146, 2014.

DUCATI, Rodrigo Gay et al. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

FALZON, Dennis et al. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. **European Respiratory Journal**, v. 49, n. 3, p. 1602308, 2017.

FLOSS, Heinz G.; YU, Tin-Wein. Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, p. 621-632, 2005

FOGEL, Nicole. Tuberculosis: a disease without boundaries. **Tuberculosis**, v. 95, n. 5, p. 527-531, 2015.

FOX, Wallace; ELLARD, Gordon A.; MITCHISON, Denis A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 3, n. 10, p. S231-S279, 1999.

FRAUNFELDER, Frederick W.; SADUN, Alfredo A.; WOOD, Terry. Update on ethambutol optic neuropathy. **Expert opinion on drug safety**, v. 5, n. 5, p. 615-618, 2006.

FRIEDEN, Thomas R.; DRIVER, Cynthia R. Tuberculosis control: past 10 years and future progress. **Tuberculosis**, v. 83, n. 1-3, p. 82-85, 2003.

GUIMARÃES, Serafim; MOURA, Daniel; SOARES DA SILVA, Patrício. *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*. Porto: Porto Editora, 2006.

GU, Jian-Qiao et al. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. **Planta medica**, v. 70, n. 06, p. 509-514, 2004.

HUF, Gisele et al. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. **J Bras Pneumol**, v. 38, n. 2, p. 237-245, 2012.

LIMA, Jaderson S. et al. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da SOCERJ**, v. 16, n. 4, p. 225-233, 2003.

LUCAS, R. et al. Synthesis and enzyme inhibitory activities of a series of lipidic diamine and aminoalcohol derivatives on cytosolic and secretory phospholipases A2. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 10, n. 3, p. 285–8, 7 fev. 2000.

LYNCH, Kevin R.; MACDONALD, Timothy L. Sphingosine 1-phosphate chemical biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 9, p. 508-512, 2008.

MACIEL, Marina de Souza et al. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. **Revista da Sociedade Brasileira de Tuberculose**, v. 10, n. 3, p. 226-30, 2012.

MANDALA, Suzanne et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 346-349, 2002.

MASTROENI, MARCO FABIO. Biossegurança aplicada a laboratórios. 2ª Ed. **Atheneu**: Rio de Janeiro, 2005. 338 p.

MASUNARI, Andrea; TAVARES, Leoberto Costa. Estudos de QSAR-3D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 281-294, 2007

MCQUISTON, Travis J.; HALLER, Charles; DEL POETA, Maurizio. Sphingolipids as targets for microbial infections. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 6, n. 6, p. 671-680, 2006.

MIGLIORI, Giovanni Battista et al. Drug resistance beyond extensively drug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 42, n. 1, p. 169-179, 2013.

MIKUSOVÁ, K. et al. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2484–9, nov. 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Boletim epidemiológico: Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença**. 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-009.pdf>> Acesso em junho de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. 2ª edição. 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/25/manual-recomendacoes-tb-20mar19-isbn.pdf>> Acesso em junho de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual nacional de vigilância laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias. 1º Ed. **Ministério da Saúde**: Brasília, 2008. 436p.

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, 16 dez. 1983.

OLMO E.d. MOLINA-SALINAS G.M.; ESCARCENA R.; ALVES M.; LÓPEZ-PÉREZ J.; HERNANDEZ-PANDO R.; SAID-FERNANDEZ S.; FELICIANO A.S. Simple dihydrosphingosine analogues with activity against MDR-tuberculosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 5764-68, 2009.

OLMO E.d; PLAZA A.; MURO A.; MARTÍNEZ-FERAÁNDEZ A.R.; NOGAL-RUIZ J.J.; LÓPEZ-PÉREZ J.L.; FELICIANO A.S. Synthesis and avaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 6091-95, 2006.

PALOMINO, Juan-Carlos et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PÔRTO, Ângela. Representações sociais da tuberculose: estigma e preconceito. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, p. 43-49, 2007.

PRUETT, Sarah T. et al. Thematic Review Series: Sphingolipids. Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 8, p. 1621-1639, 2008.

RIEDER, Hans L. et al. Epidemiologic basis of tuberculosis control. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), 1999.

ROGERO, Sizue O. et al. Citotoxicidade in vitro das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, p. 1-5, 2000.)

ROSEMBERG, José. Tuberculose-Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de pneumologia sanitária**, v. 7, n. 2, p. 5-29, 1999

ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 525-532, 2002.

SANCHOTENE, K. O. 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, jan. 2008.

SENSI, P. History of the development of rifampin. **Reviews of infectious diseases**, v. 5, n. Supplement_3, p. S402-S406, 1983.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo; GOMES, Andréia Patrícia. **Antimicrobianos–Guia Prático 2010/2011**. Editora Rubio, 2010.

SOINI, Hanna; MUSSER, James M. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry*, v. 47, n. 5, p. 809-814, 2001.

SOMOSKOVI, Akos; SALFINGER, Max. Nontuberculous mycobacteria in respiratory infections: advances in diagnosis and identification. *Clinics in laboratory medicine*, v. 34, n. 2, p. 271-295, 2014.

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. **Boletim Epidemiológico**, vol 44, 2013. Disponível em: <<http://www.vigilanciaensaude.ba.gov.br/sites/default/files/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>>. Acesso em: 20 jun 2019.

TALBOT, Elizabeth A.; RAFFA, Brittany J. Mycobacterium tuberculosis. In: **Molecular Medical Microbiology**. Academic Press, 2015. p. 1637-1653.

TAVARES, Walter et al. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. In: **Manual de Antibióticos e quimioterápicos Antiinfeciosos**. 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATOIN (WHO). **What is multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and how do we control it?**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/features/qa/79/en/>> acesso em junho de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATOIN (WHO). **WHO guidelines on tuberculosis infection prevention and control**. 2019. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311259/9789241550512-eng.pdf?ua=1&ua=1>> acesso em junho de 2019.

ZHANG, Y. et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 4, p. MGM2-0023-2013, ago. 2014.

ZHANG, Ying et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 790-795, 2003.

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

ZHENG, Wenjing et al. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 12, p. 1864-1884, 2006.