



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Bianca Padilha Cassiano

**Avaliação da atividade antimicobacteriana *in vitro* com compostos sintéticos contra
Mycobacterium tuberculosis cepa H37Ra**

Florianópolis
2025

Bianca Padilha Cassiano

**Avaliação da atividade antimicobacteriana *in vitro* com compostos sintéticos contra
Mycobacterium tuberculosis cepa H37Ra**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Bazzo
Coorientadora: Dr.^a Letícia Muraro Wildner

Florianópolis

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido força e resiliência para seguir durante todo o processo e realização de cada sonho que vivi durante esses 5 anos de graduação.

A minha família, principalmente meus pais, Sérgio e Gilséia, que são a minha maior inspiração. Vocês me ensinaram desde cedo que o conhecimento é a base de tudo e que a educação deveria ser sempre uma constante em minha vida. Acreditando em meu potencial, me deram todo o apoio e apesar da distância e da saudade diária, estiveram sempre presentes em meu coração. Vocês são o meu alicerce. Ao meu irmão Bruno, meu grande amigo, que tornou este processo mais leve e sempre me motivou a continuar lutando pelos meus sonhos. Amo vocês com todo o meu coração e sou imensamente grata por tudo.

À minha orientadora, Professora Maria Luiza, por ser uma pessoa tão inspiradora e determinada, que nos presenteia com tanto conhecimento e se torna uma inspiração para cada pessoa que a conhece. Tenho uma imensa gratidão por ter aceitado reabrir a pesquisa na área da tuberculose, oportunidade para que eu pudesse realizar meu projeto nesta área que tanto desejei

À minha coorientadora, Letícia, minha sincera gratidão por ser essa pessoa sempre gentil e atenciosa. Mesmo sem me conhecer previamente, você prontamente aceitou ser minha coorientadora e me guiou com dedicação, não poupando esforços para me auxiliar nesta jornada, mesmo à distância, através de nossas reuniões. Obrigada por tudo, você é uma inspiração.

À toda a equipe do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS), em especial à Manu, que me ensinou os fundamentos e os protocolos de biossegurança para o trabalho com tuberculose. Aos Marcos e Fernando, que me auxiliaram na execução dos ensaios e sempre estiveram disponíveis para sanar dúvidas e me auxiliar em todo este processo. Ao LBMMS, que, durante esses dois anos e meio, me proporcionou tantos amigos queridos: Adri, Renata, Chris, Rafa, Jéssica e Julia. Obrigada pela parceria de sempre!

Aos colegas que a UFSC me apresentou, em especial às minhas amigas Gabrieli e Lavínia, que estiveram ao meu lado durante todo esse período, me auxiliando e me motivando a não desistir.

Por fim, este trabalho representa não apenas a conclusão de uma etapa acadêmica, mas a finalização de um sonho, realizado com muita dedicação, apoio e o amor de todos que estiveram ao meu lado. Que cada aprendizado aqui seja um degrau para novas conquistas. Sou grata por toda a jornada e por cada um que fez parte dela, e sigo adiante com o coração cheio de esperança para novos desafios.

RESUMO

A tuberculose (TB), causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* continua sendo a doença infecciosa com maior letalidade global, com 10,8 milhões de novos casos diagnosticados mundialmente em 2023. A crescente emergência de cepas resistentes e multirresistentes aos micobacterianos convencionais tem imposto desafios significativos ao tratamento, intensificando a necessidade de pesquisa e triagem de novos fármacos com mecanismos de ação inovadores. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade antimicobacteriana *in vitro* de uma série de compostos sintéticos contra a cepa padrão *M. tuberculosis* H37Ra. Inicialmente, 26 compostos foram submetidos a uma triagem preliminar em concentração 100 µg/ml. Aqueles que demonstraram atividade foram subsequentemente avaliados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e, posteriormente, para a concentração bactericida mínima (CBM). Dentre os compostos testados, cinco se destacaram como promissores: HTG-1-R, HTG-9-R, HTG-12-R, HT-14-R e IMG-4-R, todos derivados da síntese de aminas. Os valores de CIM foram determinados em 6,25 µg/ml para o HTG-1-R e HTG-14-R, 25 µg/ml para HTG-9-R e HTG-12-R, e 50 µg/ml para IMG-4-R. A avaliação das CBMs revelou que os compostos HTG-12-R, HTG-14-R e IMG-4-R apresentaram CBMs correspondentes a 2x CIM. O composto HTG-9-R exibiu uma CBM de 4x CIM, enquanto o HTG-1-R demonstrou ser bactericida na mesma concentração da CIM (1x CIM), indicando um forte potencial bactericida já na concentração inibitória. Esses resultados demonstram o potencial significativo desses compostos como candidatos para o desenvolvimento de novos agentes antimicobacterianos. Para uma maior caracterização e a validação de seu perfil terapêutico, são necessários estudos adicionais, incluindo ensaios de citotoxicidade, cálculo do índice de seletividade, análise da curva de tempo de morte bacteriana, avaliação da eficácia frente a isolados clínicos e investigação detalhada dos seus mecanismos de ação.

Palavras-chaves: Tuberculose; Novos fármacos; Atividade antimicobacteriana.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains the infectious disease with the highest global fatality rate, with 10,8 millions of new cases diagnosed worldwide in 2023. The growing emergence of drug-resistant and multi-drug-resistant strains to first and second line treatments poses significant challenges, intensifying the urgent need for research and screening of novel drugs with innovative mechanisms of action. This study primarily aimed to evaluate the *in vitro* antimycobacterial activity of a series of synthetic compounds against the standard strain *M. tuberculosis* H37Ra. Initially, 26 compounds were screened at 100 µg/mL. Those demonstrating activity were subsequently evaluated for their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and, later, for their Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Among the tested compounds, five showed promising results: HTG-1-R, HTG-9-R, HTG-12-R, HTG-14-R, and IMG-4-R, all derived from amine synthesis. MIC values were determined as 6.25 µg/ml for HTG1R and HT14R, 25 µg/ml for HTG-9-R and HTG-12-R, and 50 µg/ml for IMG-4-R. MBC evaluations revealed that compounds HTG-12-R, HTG-14-R, and IMG-4-R exhibited MBCs corresponding to 2x MIC. Compound HTG-9-R displayed an MBC of 4x MIC, while HTG-1-R demonstrated bactericidal activity at the same concentration its MIC (1x MIC), indicating strong bactericidal potential even at its inhibitory concentration. The results highlight the significant potential of these compounds as candidates for the development of new antimycobacterial agents. For further characterization and validation of their therapeutic profile, additional studies are required, including cytotoxicity assays, selectivity index calculation, bacterial killing curve analysis, evaluation of efficacy against clinical isolates, and detailed investigation of their mechanisms of action

Keywords: Tuberculosis; New Drugs; Antimycobacterial Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Envelope celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Figura 2 – Processo de infecção por <i>M. tuberculosis</i>	25
Figura 3- Colônias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio Ogawa-Kudoh	29
Figura 4- Novos medicamentos para tuberculose em estudos pré-clínicos e clínicos em 2024.	34
Figura 5 - Cultura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa H37Ra	37
Figura 6 - Mapa da placa para determinação de CIM de INH	39
Figura 7 Cromatografia em coluna de adsorção.....	43
Figura 8 Aliquota do composto diluído em DMSO	45
Figura 9 Mapa da placa 01	46
Figura 10 Mapa da placa 02	46
Figura 11 Mapa da placa 03	47
Figura 12 Mapa da placa 01 determinação da CIM	48
Figura 13 Mapa da placa 02 placa determinação da CIM.....	48
Figura 14 Mapa da placa 03 para determinação da CIM	49
Figura 15 Mapa da placa 04 para determinação da CIM	49
Figura 16 Preparação do meio 7H10.....	50
Figura 17 Placas com meio sólido 7H10.....	50
Figura 18 Placa de controle de esterilidade.....	51
Figura 19 Fluxograma da metodologia do projeto	52
Figura 20 Lâmina de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
Figura 21 Colônias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio sólido 7H10	56
Figura 22 - Estrutura dos compostos efetivos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ..	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Crescimento da cepa H37Ra.....	38
Gráfico 2 - Avaliação da atividade bactericida dos compostos frente <i>M. tuberculosis</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Crescimento bacteriano	38
Tabela 2 - Compostos sintéticos provenientes do ácido gálico	41
Tabela 3 Compostos sintéticos provenientes de aminas	42
Tabela 4 - Diluição dos compostos	44
Tabela 5 CIM dos compostos	54
Tabela 6 Compostos e concentrações utilizados para testes de CBM frente <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	55
Tabela 7 Concentrações dos compostos que não inibiram crescimento	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP - peptidoglicano-arabinogalactana
AGNU - Assembleia das Nações Unidas
Aids - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BCG - Bacillus Calmette-Guérin
BSL-2 - Nível de Biossegurança 2
BPPL - Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários da OMS
CIM - Concentração inibitória mínima
DMSO - Dimetilsulfóxido
EPI - Equipamento de Proteção Individual
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
IFN - γ - Interferon gama
IGRA - Teste de Liberação Interferon Gama
INH - Isoniazida
InhA - Enoil-acil redutase
LACEN-SC - Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina
LTBI - Portadores de infecção latente por tuberculose
LF-LAM - Lipoarabinomanano
TB - Tuberculose
MAs - Ácidos micólicos
MBC – Concentração Bactericida Mínima
MDR – Multidroga resistente
Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*
NBS- Nível de Biossegurança 3
NF- κ B - Fator de transcrição nuclease KB
OADC - Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
ODS -Objetivo de Desenvolvimento Sustentável
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Solução salina tamponada com fosfato
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PZA - Pirazinamida
RIF - Rifampicina
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	ETIOLOGIA.....	20
2.2	HISTÓRIA.....	20
2.3	CEPAS.....	21
2.4	ESTRUTURA.....	22
2.5	EPIDEMIOLOGIA.....	23
2.6	BIOSSEGURANÇA.....	23
2.7	PATOGÊNESE	24
2.7.1	Transmissão	24
2.7.2	Granuloma	26
2.8	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	26
2.9	DIAGNÓSTICO	27
2.9.1	Radiografia de tórax.....	27
2.9.2	Microscopia de escarro	27
2.9.3	Cultura.....	28
2.9.4	Teste de diagnóstico molecular.....	29
2.9.5	Teste Derivado Proteico Purificado	30
2.9.6	Teste de Liberação Interferon-Gama	30
2.10	TRATAMENTO.....	31
2.11	RESISTÊNCIA.....	32
2.12	NOVOS FÁRMACOS	33
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL.....	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	MATERIAS E MÉTODOS.....	37
5.1	LOCAL DO ESTUDO	37
5.1	CULTIVO DAS CEPAS DE MICOBACTÉRIAS	37
5.2	PREPARO DA RESAZURINA	38
5.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA ISONIAZIDA	39

5.3.1	Determinação da Concentração Inibitória mínima de INH com cepa H37Rv .	39
5.3.2	Determinação da Concentração Inibitória mínima de INH com cepa H37Ra .	40
5.3.3	Coloração de Ziehl Neelsen.....	40
5.4	COMPOSTOS	40
5.5	DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS.....	43
5.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA IN VITRO ...	45
5.6.1	TRIAGEM DOS COMPOSTOS.....	45
5.6.2	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	47
5.6.3	CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA.....	49
5.7	FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA.....	51
6	RESULTADOS	53
6.1	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA ISONIAZIDA	53
6.1	MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEH NEELSEN.....	53
6.2	ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA IN VITRO	54
7	DISCUSSÃO	57
8	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas conhecidas pela humanidade (Smith, 2003), é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) um patógeno humano obrigatório, transmitido pelo ar. Em 2023, a TB causou 1,25 milhão de mortes no mundo, sendo a principal causa de morte por doença infecciosa (OMS,2023). Embora seja considerado principalmente um patógeno pulmonar, *Mtb* pode causar doença em várias partes do corpo e desenvolveu uma ampla variedade de estratégias para prosperar no hospedeiro. Ao longo dos anos, o tratamento para TB passou por diferentes modificações e atualmente consiste em uma terapia com combinações de diferentes fármacos e por um longo período, visando eliminar o foco da infecção e interromper a cadeia de transmissão (Pai *et al.*, 2016).

O rápido surgimento de resistência às terapias existentes para TB ressalta a necessidade urgente de garantir uma gestão adequada dos antimicrobianos e de um esforço conjunto para desenvolver novos regimes eficazes contra as cepas resistentes a medicamentos atualmente em circulação (Liebenberg; Gordhan; Kana, 2022). Em resposta a esses problemas a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou em 2015 o Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana, que prioriza os investimentos em pesquisa e desenvolvimento, como cruciais para prevenir e controlar esse problema. Novas ferramentas, bem como a melhoria da implementação e do financiamento de programas, são necessárias para erradicar a epidemia global de TB até 2035 (Pai *et al.*, 2016). Isso exige esforços contínuos em prevenção, acesso equitativo aos serviços de saúde, medidas abrangentes de controle de infecções e vacinação.

A pesquisa direcionada à descoberta de novos fármacos antituberculose é de urgência inegável para combater o *Mycobacterium tuberculosis*. A introdução de novos medicamentos não tem acompanhado o surgimento das cepas resistentes (Pai *et al.*, 2016), um cenário que reforça a importância primordial de investir em pesquisa e no desenvolvimento de estratégias inovadoras para enfrentar esta bactéria.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Mycobacterium* foi nomeado em 1896 por Lehmann e Neumann. Atualmente, esse gênero compreende mais de 190 espécies nomeadas (Tortoli *et al.*, 2017; Tortoli *et al.*, 2019), frequentemente divididas em bactérias de crescimento rápido e de crescimento lento (Fedrizzi *et al.*, 2017). Em 2018, com base na sequência do genoma completo, houve a divisão em cinco gêneros, sendo eles *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus*, *Mycobacteroides* e *Mycobacterium* (Gupta; Lo; Son, 2018).

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo pequeno, em forma de bastonete, estritamente aeróbico e ácido-resistente, responsável pela TB. Como outras micobactérias, o *M. tuberculosis* distingue-se pelo seu crescimento lento, com um tempo de geração de aproximadamente 20 horas. Essa característica é crucial, pois contribui para o desenvolvimento mais gradual da doença em comparação com outras infecções bacterianas. A parede celular do *M. tuberculosis* é excepcionalmente rica em lipídios, conferindo-lhe propriedades únicas e essenciais para sua patogenicidade (Bigi *et al.*, 2023)

2.2 HISTÓRIA

A TB ainda está longe de ser erradicada do mundo, sendo um dos maiores desafios da saúde pública mundial. Essa doença tem sua descrição mais antiga encontrada nos Vedas, mencionada como doença debilitante e chamada de *Yakshilitermas*. Há registros em outras civilizações como grega, chinesa e árabe, por meio de relatos de uma doença semelhante a TB. Para comprovar essas descrições foram realizados estudos de paleopatologia que mostraram lesões vertebrais típicas da doença em múmias das eras de pré-dinastia egípcia e pré-colombiana. A evidência mais antiga disponível associada a TB foi obtida pela análise em uma criança e mulher neolíticas no Mediterrâneo Oriental de 9 mil anos, sendo possível graças ao sequenciamento genético (Natarajan *et al.*, 2020).

A TB miliar foi descrita pela primeira vez por Thomas Wills, mas o termo TB se originou em 1845 por Johann Lukas Schönlein, palavra deriva de “tubérculo”, que significa pequeno nódulo. Antes mesmo da descoberta do bacilo por Robert Koch em 1821, o pesquisador René Theophile Hyacinthe Lanennce publicou a obra “Um tratado sobre Doenças em Tórax” no qual apresentava a descrição de lesões pulmonares e alterações patológicas semelhantes em várias partes do corpo. Em 1868 Jean-Antoine Villemin estabeleceu a natureza

infecciosa da doença, de humanos para coelhos e outros animais, inferindo que a TB era uma doença transmissível, ele publicou seu estudo médico intitulado “*Etudes sur la Tuberculosis*” (Estudos sobre a Tuberculose)(Schluger, 2005). Apenas em 1882, na Reunião da Sociedade de Fisiologia de Berlim, Robert Koch apresentou com êxito os resultados do isolamento do bacilo da TB. Na ocasião, ele detalhou as técnicas de coloração e o meio de cultura desenvolvidos para o cultivo do patógeno, além de demonstrar o modo de transmissão do bacilo, identificando assim o agente causador da doença. O pesquisador nomeou o patógeno como “vírus da tuberculose”, posteriormente Leon Charles Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram a vacina BCG a partir do cultivo de *Mycobacterium bovis* (Natarajan *et al.*, 2020).

2.3 CEPAS

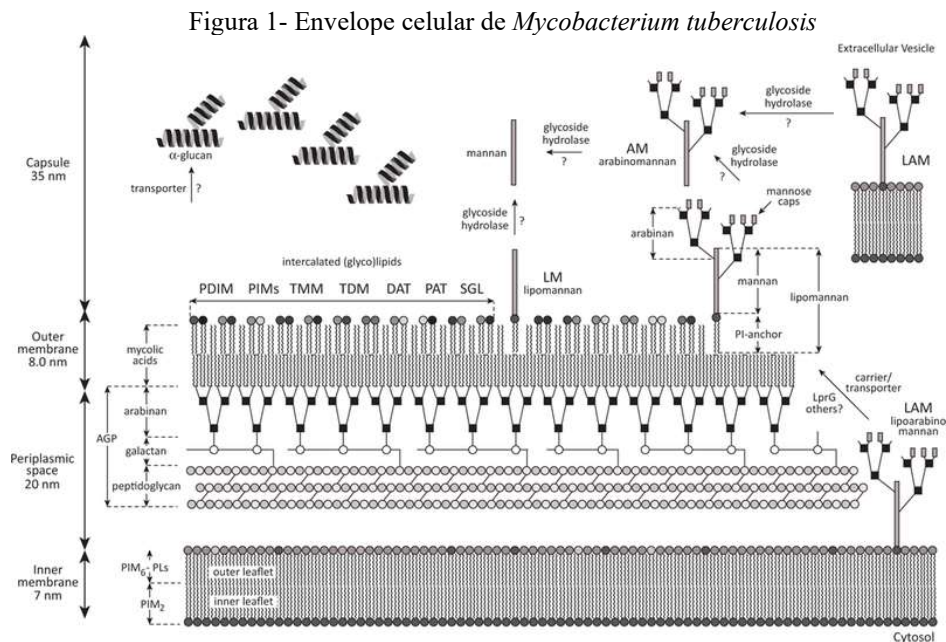
As cepas H37Ra e H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) representam modelos cruciais em estudos de patogênese e virulência da TB. Ambas são derivadas da cepa parental H37, isolada originalmente em 1905 de um paciente (Steenken; Gardner, 1946). Apesar de apresentarem similaridades genômicas em termos de ordem e conteúdo, a distinção fundamental entre elas reside em sua virulência e características fenotípicas, resultantes de eventos genéticos específicos.

A cepa H37Ra, um derivado avirulento, teve sua obtenção em 1935, através de um processo conduzido por William Steken. O método se consistiu no cultivo prolongado de bacilos da cepa H37 em meio de ovo sólido, mantido a 37°C por um período de três a quatro meses. Ao final desse período, as colônias originais de H37 se transformaram em uma massa, dentro da qual foi observada uma colônia com morfologia distinta. Subsequentemente, essa nova colônia foi isolada e cultivada. Testes de virulência *in vivo* foram realizados em porquinhos-da-índia e demonstraram que essa variante não produzia a doença, o que levou a sua designação como H37Ra. Em contrapartida, as colônias que mantiveram a morfologia original e a capacidade de causar a doença foram denominadas H37Rv (Steenken, 1935; Steenken, 1938).

A análise comparativa revela que a cepa H37Ra exibe 21 deleções e 53 inserções adicionais em seu genoma em comparação a H37Rv. No entanto, o ponto crucial é que, mesmo com essas diferenças, os genomas de ambas as cepas são muito semelhantes em termos de ordem e conteúdo (Zheng *et al.*, 2008). Ambas as cepas são, portanto, ferramentas indispensáveis para a compreensão da biologia de *M.tuberculosis* e para o avanço da pesquisa em TB.

2.4 ESTRUTURA

O envelope celular de *Mycobacterium tuberculosis* é extremamente complexo, rico em lipídeos e polissacarídeos de estrutura química única (Angala *et al.*, 2014; Jankute *et al.*, 2015). A parede celular apresenta característica de baixa permeabilidade que é explicada pela organização intrincada dos componentes do envelope celular (Chiaradia *et al.*, 2017). O envelope celular micobacteriano é crítico para a função celular porque muitos processos cruciais estão localizados nessa estrutura que apresenta três componentes, demonstrados na figura 1, sendo eles a membrana plasmática que é a camada mais interna, a primeira linha de defesa. O segundo componente é o complexo peptidoglicano-arabinogalactana (AGP). A seguir, encontra-se a membrana externa assimétrica, também chamada de 'micomembrana'. Esta micomembrana é covalentemente ligada ao AGP através dos ácidos micólicos, que formam o seu folheto interno. O folheto externo da micomembrana, por sua vez, é composto principalmente de (glico)lipídios e lipoglicanos não covalentemente ligados, e é essa organização que confere a baixa permeabilidade, dificultando a penetração de antibióticos. Por fim, a última estrutura é a cápsula externa, que é composta por polissacarídeos neutros e um α -glucano semelhante ao glicogênio (Chiaradia *et al.*, 2017; Kalscheuer *et al.*, 2019).



A imagem representa o envelope celular de *Mycobacterium tuberculosis*, destacando suas camadas e componentes principais. Da camada mais externa para a interna, são visualizadas a cápsula, a membrana externa, espaço periplasmático e a membrana interna. A organização única dessas estruturas é fundamental para a virulência e resistência do bacilo. Fonte: Kalscheuer *et al.*, 2019

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Os bacilos de *M. tuberculosis* infectam cerca de um quarto da população mundial, segundo a OMS. No ano de 2023 a TB pode ter superado o número de casos de Covid-19 e se mantendo como a principal causa de morte por um único agente infeccioso no mundo. Cerca de 10,8 milhões de pessoas adoeceram por TB e 1,35 milhão morreram devido a doença no ano de 2023 (OMS,2024). O Brasil está entre os 30 países, sendo o único na região das Américas, que apresentam alta carga de TB e da coinfeção TB-HIV (OMS,2024).

Durante a 70ª Assembleia das Nações Unidas (AGNU) no ano de 2015 foram estabelecidas metas mundiais, dentre as estabelecidas para o ano de 2030, destaca-se o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3, que afirma assegurar a vida saudável e promoção de bem-estar, sendo que a meta 3.3 visa acabar com as epidemias de Aids, tuberculose, malária e doenças tropicais negligenciadas e combater as hepatites, as doenças transmitidas pela água e outras doenças transmissíveis até o ano de 2030 (Brasil, 2024). A Estratégia Global pelo Fim da Tuberculose (*End TB Strategy*) visa reduzir a incidência de TB em 90% e as mortes em 95% até o ano de 2035 (OMS, 2014).

Segundo os últimos registros na Organização Pan-Americana de Saúde o número de casos de TB aumentou 20% nos últimos 10 anos. Representando cerca de 900 novos casos diagnosticados por dia nas Américas. As populações mais afetadas nessas regiões são povos indígenas, imigrantes, moradores de rua, pacientes imunossuprimidos e pessoas privadas de liberdade (OPAS, 2025).

O Boletim Epidemiológico de Tuberculose de 2024 demonstra que no ano de 2024 foram notificados mais de 84 mil casos novos de TB, sendo um número 21% maior de novos casos comparado ao período da pandemia e pós pandemia, entre os anos de 2020 e 2024. Dentre os perfis destaca-se que cerca de 68% dos casos ocorrem em pessoas do sexo masculino, com incidência superior em todas as faixas etárias, exceto no grupo de 10 a 14 anos. O número de óbitos no ano de 2023 foi superior a 6 mil mortes. A adesão ao tratamento e cura foi relatada em 66% dos pacientes no ano de 2023 e cerca de 15% dos pacientes interromperam o tratamento (Brasil,2025).

2.6 BIOSSEGURANÇA

Os laboratórios são categorizados em diferentes níveis de biossegurança, para garantir a segurança dos pesquisadores e do ambiente externo. O Nível de Biossegurança nível 3 (NBS-3) é aplicado em ambientes que manipulam agentes infecciosos capazes de causar doenças graves e condições potencialmente letais em humanos (Bayot; King, 2022). Esses laboratórios

são projetados com rigorosos padrões de contenção para proteger o trabalhador e prevenir a liberação de patógenos. No entanto, a construção e manutenção das instalações NB-3 demanda um investimento financeiro alto, por isso essas estruturas são escassas em ambientes com alta carga de trabalho ou em países subdesenvolvidos.

A manipulação de *Mycobacterium tuberculosis* necessita de muitos cuidados e precauções, visto o risco de geração de aerossóis infecciosos ao manipular a bactéria. O Mtb é classificado como um organismo de categoria 3, principalmente pela sua baixa dose infecciosa e pela sua comprovada transmissão aérea (Van Soolingen *et al.*, 2014).

Para estudos envolvendo Mtb, são aceitas instalações laboratoriais nível BSL-2. Os requisitos mínimos de um laboratório devem ser de cabines de biossegurança bem conservadas, fluxos de ar direcionais sob pressão, minimização da indução de aerossóis, os materiais devem ser higienizados com um desinfetante micobactericida.

A utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) é crucial para garantir a segurança dos pesquisadores. Para a manipulação de Mtb, os EPIs essenciais incluem jalecos descartáveis, mangas compridas com punhos elásticos e fecho nas costas, que devem ser trocados regularmente. O uso de luvas é indispensável, sendo recomendado o uso de duas luvas, com uma sendo removida antes de sair da cabine de segurança biológica. Além disso, máscaras N95 são de uso obrigatório para proteger contra a inalação de aerossóis.

É fundamental que os aventais sejam removidos antes de sair do laboratório de contenção de TB. Outro fator importante para a biossegurança em um laboratório que manipula Mtb é a restrição de acesso, sendo que apenas indivíduos essenciais para a pesquisa devem ter permissão para entrar na sala. Todos os materiais utilizados são descontaminados por autoclavagem antes do descarte ou reprocessamento, assegurando a completa inativação dos microrganismos (Van Soolingen *et al.*, 2014).

2.7 PATOGÊNESE

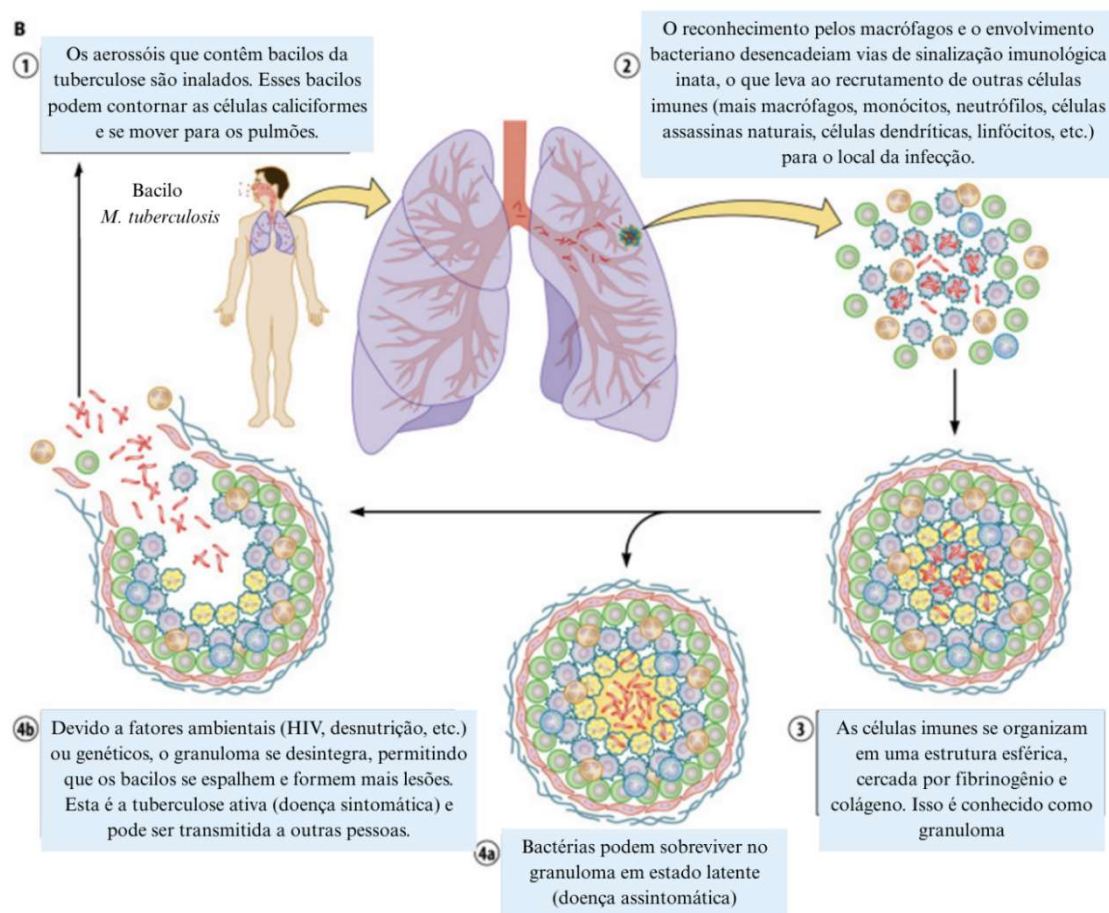
2.7.1 Transmissão

A TB é transmitida por meio de gotículas entre 1 e 5 µl de diâmetro (Knechel, 2009), que são provenientes da fala, tosse ou espirro de pessoa infectada e portadora da TB pulmonar ativa. O processo de infecção é demonstrado na figura 2. Ao serem inalados por indivíduos saudáveis, os bacilos em sua maioria, ficam presos em células caliciformes secretoras de muco, que tem como função bloquear a passagem dessas partículas, no entanto as gotículas rompem essa barreira e alcançam as partes aéreas superiores dos pulmões e assim o sistema imune é ativado. Essas partículas alcançam os alvéolos e encontram os macrófagos alveolares, iniciando

o processo infeccioso, nesse momento, os macrófagos englobam os bacilos, iniciando o processo de destruição usando enzimas proteolíticas e citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF-alfa) e o interferon gama (IFN - γ), e ocorre a sinalização para os linfócitos T irem até o local da infecção, formando assim o granuloma (Philips; Ernst, 2012).

A replicação das bactérias ocorre dentro do granuloma. Essa estrutura estável não é capaz de eliminar o patógeno, mas consegue conter os bacilos evitando a progressão da doença. Em cerca de 6 a 8 semanas, em indivíduos imunocompetentes, as lesões cicatrizam, gerando um hospedeiro assintomático e não infeccioso ou as bactérias podem sobreviver no granuloma em estado latente e pode haver evolução para TB ativa se houver alguma situação imunossupressora (Luies; Preez, 2020). No entanto, se a carga bacteriana foi muito grande, as bactérias podem se disseminar para outros órgãos. Outras vias como pele e placenta são extremamente raras e com o início de tratamento o período de transmissão é de 15 dias (Pai *et al.*, 2016).

Figura 2 – Processo de infecção por *M. tuberculosis*



Fonte: Luies; Preez, 2020

Os pacientes infectados com *Mtb* são classificados como portadores de infecção latente por TB (ILTB), em que o indivíduo apresenta um quadro assintomático e não transmissível, ou doença ativa, que ocorre após infecção primária ou após reativação associada à imunodeficiência. A progressão para a doença ativa depende de diversos fatores, incluindo genética e condições socioambientais (Rahlwes *et al.*, 2023). Assim, o paciente começa apresentar os sintomas e pode ocorrer a transmissão para novo hospedeiro iniciando novo ciclo de infecção (Rahlwes *et al.*, 2023).

2.7.2 Granuloma

O granuloma é uma estrutura que em indivíduos saudáveis conseguem restringir os bacilos e interromper a progressão da doença. Um dos desafios atuais dos medicamentos é alcançar o patógeno dentro dessa estrutura (Alsayed; Gunosewoyo, 2023), pois a bactéria pode permanecer viva por décadas, podendo persistir em um estado não replicante ou de replicação lenta (Luies; Preez, 2020).

Ao longo dos anos, o granuloma passa por um processo de amadurecimento, onde os macrófagos sofrem diferenciação para macrófagos espumosos e outros vários morfotipos (Russell *et al.*, 2009). Essas células encontram-se ao redor dos focos necróticos do granuloma (Chai; Zhang; Liu, 2018).

O granuloma pode ser classificado em três diferentes formas, sendo elas: o granuloma sólido, formado por várias células imunes, está associado aos estágios finais da doença, ocorre um dano tecidual e não há presença de necrose (Born *et al.*, 1986). O granuloma necrótico é a fase após a progressão do granuloma sólido, como o próprio nome diz há presença de necrose, o que afeta as bactérias que se encontram dormentes. A última fase é caracterizada pelo granuloma caseoso, onde o centro necrótico se liquefaz (Reece; Kaufmann, 2012) provendo o desenvolvimento da TB ativa (Russell *et al.*, 2009) (Grosset, 2003).

2.8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As apresentações clínicas dos pacientes dependem de uma série de fatores como o estado imunológico, progressão da doença e presença de outras coinfeções. A apresentação da doença é diferente entre TB latente e doença ativa, cerca de 5 a 10% dos indivíduos que portam os bacilos apresentam sinais clínicos e sintomas que permitam um diagnóstico clínico (Acharya *et al.*, 2020).

Os sinais típicos incluem tosse persistente, destaca-se a tosse prolongada com produção de muco e hemoptise por três semanas ou mais, desconforto no peito, fadiga, perda

de peso suores noturnos e febre. Embora sejam sintomas leves ou até inexistentes em alguns casos, geralmente ocorrem no estágio inicial (Htet; Chongsuvivatwong; Aung, 2021). A TB pulmonar gera complicações sistêmicas como stress oxidativo, hiponatremia, hipocolestremia manifestações hematológicas (Balepur; Schlossberg, 2016) e microbiota alterada (Cui *et al.*, 2012).

Outro sintoma comum nos pacientes portadores de TB é a caquexia, que é caracterizada pela perda muscular grave. Esse processo pode estar associado à ativação de muitas citocinas como IL-1, IL-2, TNF-alfa e IFN- γ (Morley; Thomas; Wilson, 2006). O TNF estimula a perda de proteína através do fator de transcrição nuclease KB (NF-kB), o que proporciona um aumento da atividade da via ubiquitina/proteassoma e gera fraqueza muscular perda de peso e fadiga (Chang *et al.*, 2013; Buyukoglan *et al.*, 2007). A concentração plasmática baixa de leptina também contribui para o agravamento da doença (Chang *et al.*, 2013), mas após o tratamento as concentrações de leptina acabam normalizando (Mexitalia *et al.*, 2017).

Apesar da TB ativa envolver sintomas relacionados ao pulmão, podem ocorrer sintomas que afetam outras áreas, como sistema nervoso central, cavidade oral e órgãos linfáticos (Luies; Preez, 2020)

2.9 DIAGNÓSTICO

A Importância de um diagnóstico precoce pode salvar vidas principalmente no controle da transmissão e redução da mortalidade. Apesar de várias técnicas de diagnóstico serem empregadas como os métodos imunológicos, radiográficos, microscópios, cultura bacteriana e sinais e sintomas clínicos, a TB envolve dificuldades como subdiagnósticos e acesso limitado aos testes (MacGregor-Fairlie *et al.*, 2020).

2.9.1 Radiografia de tórax

É uma das ferramentas mais utilizadas na etapa de triagem, os principais achados são cavitação, consolidação, massas, derrame pleural, calcificação e nódulos (Feyisa *et al.*, 2023). Embora seja uma das técnicas mais utilizadas apresenta como limitação a diferenciação de TB com as outras doenças pulmonares (Park *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2021).

2.9.2 Microscopia de escarro

A coloração de Ziehl-Neelsen se tornou um método confiável, reprodutível e de baixo custo, servindo como um importante indicador de infecciosidade. Esse método se baseia na

ligação da carbolfucsina aos ácidos micólicos bacterianos, tornando-os resistentes à descoloração por solução de álcool-ácido, o que permite a identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (Natarajan *et al.*, 2020). Apesar de sua sensibilidade variável (32% a 89%) (Figueredo *et al.*, 2020), essa técnica não diferencia micobactérias tuberculosas de não tuberculosas, nem bactérias viáveis de não viáveis. Por isso, é fundamental complementar o diagnóstico com outras ferramentas para aumentar sua eficácia e confiabilidade.

A coloração de Auramina-Rodamina é uma técnica de fluorescência que utiliza os fluorocromos auramina ou rodamina, permitindo a visualização de bacilos em amarelo-fluorescente ou laranja avermelhado através da microscopia de fluorescência. Em comparação com a técnica de Ziehl-Neelsen, a Auramina-Rodamina apresenta maior sensibilidade e um tempo de análise dos esfregaços inferior, o que otimiza o processo de baciloscopia (Sala *et al.*, 2008; Laiza De Oliveira Costa -Multivix, [S.d.])

2.9.3 Cultura

A cultura para *Mycobacterium tuberculosis* é reconhecida como o padrão-ouro para o diagnóstico da TB, independentemente de ser realizada em meio sólido ou líquido. Com alta qualidade técnica, a cultura pode detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis por mililitro. O cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* pode ser realizado em instalações laboratoriais nível BSL-2 e requer treinamento dos analistas do laboratório, o que gera restrições para capacidade diagnóstica em locais que não apresentam esses pré-requisitos. Os meios sólidos Ogawa Kudoh e Löwenstein-Jensen são os meios seletivos mais utilizados para espécies de Mtb, pois apresentam em sua constituição verde de malaquita. O crescimento é caracterizado pelo longo tempo de em cultura sólida levando de sete dias a seis semanas para produzir as primeiras colônias visíveis em meio sólido, como demonstrado na figura 3 (Xu; Wang; Xu, 2020). Apesar do longo tempo de crescimento na cultura, esse método é utilizado para avaliação da eficácia e progresso do tratamento, sendo realizados esfregaços de escarro repetidos mensalmente (Salam *et al.*, 2014).

Figura 3- Colônias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio Ogawa-Kudoh



Fonte: De autoria própria

A partir da década de 1980, houve um avanço significativo nos métodos de cultura com o desenvolvimento de sistemas automatizados que utilizam meio de cultura líquido. Embora o processamento e a semeadura das amostras nesses sistemas sejam similares aos métodos clássicos, a incubação é monitorada por um sistema informatizado. Essa automação permite a detecção do crescimento celular de forma mais rápida, reduzindo o tempo necessário para a leitura do exame (Brasil, 2022).

A principal vantagem da cultura em meio líquido automatizada reside na agilidade do diagnóstico. Estudos demonstram que o tempo médio para detecção de micobactérias em cultura líquida automatizada é significativamente menor (aproximadamente 14 dias) em comparação com a cultura sólida (aproximadamente 27 dias). Essa redução pela metade no tempo de detecção é crucial, pois a confirmação bacteriológica de casos ativos é fundamental para o diagnóstico e o início do tratamento da TB, além de permitir a realização do teste de sensibilidade a antibióticos para *Mycobacterium tuberculosis* (Brasil, 2020).

2.9.4 Teste de diagnóstico molecular

Gradualmente os testes moleculares estão sendo incorporados, gerando uma detecção rápida e precisa, bem como a detecção da resistência aos medicamentos (MacLean *et al.*, 2020). O ensaio Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) foi um dos ensaios aprovados, que apresenta como metodologia a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, realizando a detecção de Mtb e simultaneamente identificando amostras resistentes à Rifampicina, um dos medicamentos da primeira linha de tratamento para TB, através da amplificação de um segmento específico da região determinante da resistência que distingue a resistência a RIF do tipo selvagem associada a mutação (CEPHEID, 2020). Apesar dos avanços nessa área, a OMS recomenda que esses testes moleculares não substituam o método de cultura, mas sim que sejam aplicados como uma ferramenta complementar.

2.9.5 Teste Derivado Proteico Purificado

O PPD (derivado proteico purificado) é um método acessível, que consiste na aplicação de uma injeção intradérmica de 0,1 ml de derivado proteico (PPD), esse teste promove a reação de hipersensibilidade tardia do organismo diante das proteínas do bacilo da TB (Brasil, 2014). A leitura é realizada entre 48 e 72 horas por um profissional de saúde, através da análise do diâmetro da área elevada e endurecida em milímetros. O resultado é considerado positivo quando a medida apresentar ≥ 15 mm, no entanto para pacientes imunossuprimidos pode-se considerar um ponto de corte no valor de ≥ 5 mm (CDC, 2024; Luies; Preez, 2020). Esse método pode gerar resultados falsos positivos em crianças menores de três anos, justificado pela vacina da BCG, por isso para esses casos recomenda-se o uso de IGRAs, que são testes *in vitro* de liberação de interferon gama.

O PPD apresenta algumas limitações técnicas e de produção em quantidade suficiente para a demanda, porém tem um custo-benefício muito considerável, bem como a aplicabilidade no campo, sendo uma ferramenta essencial para detecção de LTBI (Infecção Latente da Tuberculosis). Uma alternativa para pacientes (LTBI) é o teste rápido de fluxo lateral para detecção de lipoarabinomanano (LF-LAM) realizado em amostra de urina sendo utilizado para o diagnóstico de TB ativa em pessoas vivendo com HIV (Brasil, 2022b).

2.9.6 Teste de Liberação Interferon-Gama

O Teste de Liberação de Interferon-Gama (IGRA) é um exame realizado através da estimulação *in vitro* de linfócitos humanos. Para isso, utilizam-se antígenos como o secretor precoce-alvo 6 (ESAT-6) e a proteína filtrada de cultura -10 (CFP-10). O objetivo principal é analisar os níveis de IFN- γ , sendo este um método considerado de maior sensibilidade e especificidade em comparação a outros, conforme o Ministério da Saúde (Brasil, 2020).

O IGRA demonstra desempenho superior ao teste tuberculínico tradicional (PPD) na acurácia para a identificação da TB latente, na previsão da progressão para TB ativa e na associação de resultados positivos com fatores de risco. Além disso, sua realização exige apenas uma visita do paciente ao laboratório, o que facilita o processo diagnóstico.

No Brasil, em 6 de dezembro de 2022 foi publicada a portaria SCTIE/MS nº 171, que tornou pública a decisão de ampliar o uso, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, do Teste de Liberação de Interferon-gama (IGRA) para detecção de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com doenças inflamatórias imunomediadas ou receptores de transplante de órgãos sólidos.

2.10 TRATAMENTO

Na década de 1940 foram descobertos os primeiros medicamentos que atuam contra *Mtb*. Dentre eles, destacam-se estreptomicina, ácido para-amino salicílico e isoniazida. Os antimicrobianos para tratar TB estão disponíveis há mais de 60 anos e longo dos anos o tratamento passou por modificações. Atualmente consiste na combinação de quatro fármacos por um período de no mínimo 6 meses com doses diárias (Zumla; Nahid; Cole, 2013). Segundo o Manual de Recomendações e Controle da Tuberculose (Brasil, 2019), os regimes de tratamento para adultos no Brasil consistem em rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), isoniazida (INH) e etambutol (EMB) na fase intensiva com duração de 2 meses, e RIF e INH com duração de 4 meses na fase de manutenção. O tratamento da TB meningoencefálica e osteoarticular em adultos e adolescentes é de RIF, INH, PZA e EMB por 2 meses, e RIF e INH por 10 meses. Para crianças (< 10 anos de idade), o esquema de tratamento é de dois meses de RIF, INH e PZA e quatro meses utilizando RIF e INH, já para tratamento da TB meningoencefálica e osteoarticular em crianças (< 10 anos de idade) são de dois meses de administração de RIF, INH e PZA e 10 meses de RIF e INH. Destaca-se, portanto, que o tratamento da TB se torna um processo desafiador com implicações para o paciente e para a saúde pública.

O tratamento eficaz necessita que o regime de medicamentos contenha fármacos que consigam atingir os organismos dentro dos vários compartimentos da bactéria. Os fármacos de primeira linha apresentam diferentes mecanismo de ação, a INH é um pró-fármaco que atua inibindo a proteína transportadora enoil-acil redutase (InhA), uma enzima chave na biossíntese dos ácidos micólicos (MAs). O aduto isoniazida-NAD forma um inibidor de ligação estreita e lenta da InhA de *Mycobacterium tuberculosis* (Rawat, Whitty & Tonge, 2003). Os MAs são os principais mediadores das propriedades hidrofóbicas e da baixa permeabilidade do revestimento externo micobacteriano (Marrakchi, Laneelle & Daffe, 2014).

A RIF possui ação bactericida ao inibir a transcrição genética através da ligação à subunidade beta da RNA polimerase bacteriana (Scriba *et al.*, 2017). A PZA é um pró-fármaco que é ativado em ácido pirazinoico pela enzima pirazinamidase, um processo que ocorre após sua difusão no granuloma. Esse fármaco é capaz de eliminar o bacilo dentro do granuloma, embora mais estudos sejam necessários para elucidar completamente seu mecanismo de ação (Zhang & Mitchison, 2003). O mecanismo de ação do EMB é sobre a síntese da parede celular bacteriana, interferindo na produção de arabinogalactano e lipoarabinomanana, componentes essenciais da parede celular, por meio da inibição das arabinosiltransferases EmbA, EmbB e EmbC. Este fármaco possui ação bacteriostática (Goude *et al.*, 2009).

Nos últimos anos nota-se que a resistência e intolerância à primeira linha de tratamento está crescendo, dentre os principais fatores que determinam a desistência do tratamento os principais relatos são de desconforto gastrointestinal, hepatotoxicidade com valores de transaminases elevados e a lesão hepática induzida por esses fármacos (Tostmann *et al.*, 2008). O paciente é submetido a tratamentos que demandam um período maior para tuberculose multirresistente (MDR-TB) classificada como uma cepa resistente a Rifampicina e Isoniazida e tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB), que consiste em bactérias resistentes a rifampicina e isoniazida com resistência adicional a fluoroquinolonas e a pelo menos um medicamento adicional do Grupo A como levofloxacino, moxifloxacino, bedaquilina e linezolida . (Liebenberg; Gordhan; Kana, 2022; OMS, 2021).

A TB com resistência aos medicamentos pode ocorrer de duas maneiras: resistência primária, quando ocorre transmissão de bactérias resistentes, e secundária, quando é desenvolvida durante o tratamento da doença que está associado a diversos fatores como o não cumprimento do regime de tratamento pelo paciente (abandono), prescrição errada de tratamento e interações medicamentosas (CDC, 2024). Para pacientes XDR e MDR, são necessários regimes de medicação longos, que contenham agentes que sejam altamente ativos e capazes de atingir o organismo dentro dos vários compartimentos (Scriba *et al.*, 2017).

A TB multirresistente continua a ser um desafio significativo para a saúde pública no Brasil. As estimativas atuais apontam para 410 mil casos dessa forma da doença no país. Entre 2015 e 2023, foram notificados 17.200 casos de tuberculose resistente, com registros preocupantes em todos os estados brasileiros. Dentre os municípios, Rio de Janeiro, Manaus e Belém foram os que apresentaram o maior número de ocorrências. Esses dados reforçam a urgência em intensificar as ações de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento adequado para combater a disseminação da TB-MDR em todo o território nacional, com um foco especial nas áreas mais afetadas (Brasil,2024).

2.11 RESISTÊNCIA

Em 2015, a OMS criou o Plano de Ação Global relacionado à Resistência Antimicrobiana, que visa priorizar os investimentos em pesquisa e desenvolvimento nessa área, tornando-se essencial para o controle da resistência antimicrobiana. Patógenos resistentes a antibióticos geram maior carga e maiores custos à saúde. Por isso, torna-se necessário o investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para que as respostas na saúde pública sejam fortalecidas. Destaca-se que o *M. tuberculosis* resistente à rifampicina é um dos patógenos prioritários e críticos presentes na lista de Patógenos Bacterianos Prioritários da

OMS (BPPL) de 2024, visto que apresenta desafios no diagnóstico, alto custo de tratamento e toxicidade medicamentosa, sendo de extrema importância a criação de novos agentes antimicobacterianos devido às limitações do atual pipeline de medicamentos. A partir da criação da lista BPPL, 13 novos fármacos foram direcionados aos patógenos bacterianos, e em 2018 a pretomanida foi incluída como regime de tratamento para *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente e resistente à rifampicina (Sati *et al.*, 2025).

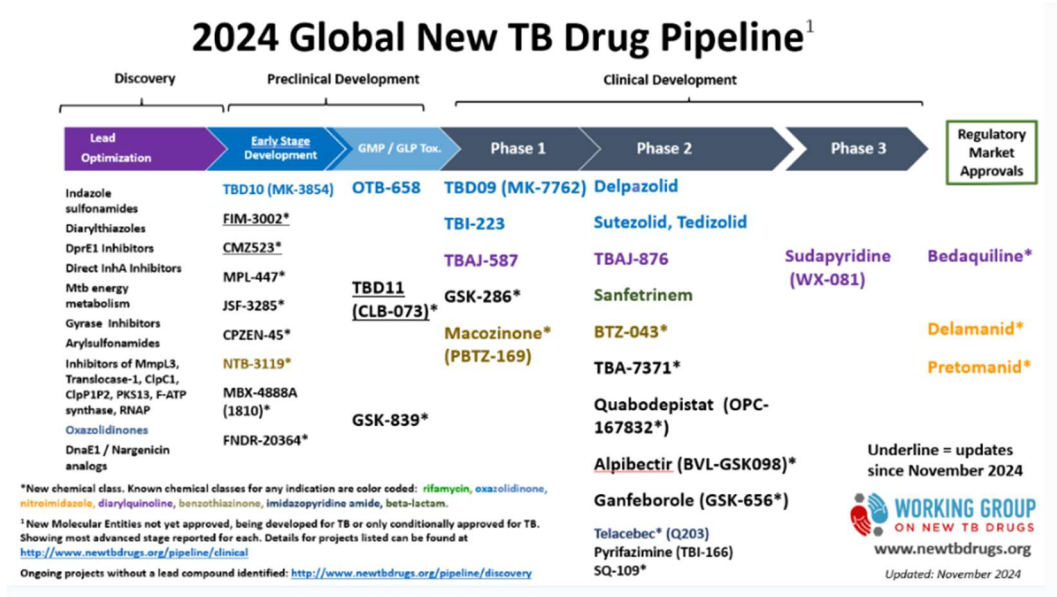
2.12 NOVOS FÁRMACOS

A baixa adesão e a interrupção prematura do tratamento prolongam o período de infecciosidade e favorecem o desenvolvimento de resistência aos medicamentos (Lienhardt *et al.*, 2012), o que pode agravar o cenário epidemiológico da TB, reforçando a necessidade de estratégias direcionadas para reduzir as taxas de abandono de tratamento, especialmente entre populações mais vulneráveis.

Os principais desafios incluem a duração prolongada de terapia e intolerância devido aos efeitos colaterais que geram abandono o que promove o aumento da resistência e redução da probabilidade de sucesso do tratamento (OMS, 2025).

Embora diversos compostos tenham sido identificados nas últimas décadas, apenas três novos fármacos foram aprovados pelo FDA nos últimos 12 anos: bedaquilina, delamanida e pretomanida (Deoghare, 2013; Schito *et al.*, 2015). A demora no desenvolvimento de novas terapias é evidente quando se observa que desde a introdução da rifampicina em 1966, transcorreram cinco décadas sem a incorporação de novos agentes à primeira linha de tratamento até a aprovação da bedaquilina em 2012 (Singh *et al.*, 2008). A bedaquilina atua bloqueando o fornecimento de energia para a bactéria agindo na ATP sintase e Delamanida bloqueia a produção de ácidos metoximicólico e cetomicólico, que são componentes da parede celular de Mtb e a pretomanida age inibindo a síntese de lipídios da parede celular da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Soares *et al.*, 2024). Na busca da descoberta de novos regimes para TB são descritos na figura 4 os fármacos que estão em estudos pré-clínicos e clínicos no ano de 2024.

Figura 4- Novos medicamentos para tuberculose em estudos pré-clínicos e clínicos em 2024.



Fonte: (Hoelscher *et al.*, 2024)

Os produtos naturais são reconhecidos por seu papel fundamental na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, com destaque para as áreas de oncologia e infectologia. Diversas classes de metabólitos secundários, isolados de fontes como plantas, fungos e organismos marinhos, têm sido avaliados quanto à atividade antimicobacteriana. Resultados promissores observados *in vitro*, especialmente com compostos de origem vegetal, reforçam a importância da prospecção de fontes naturais como estratégia para desenvolvimento de novos agentes antituberculose(Fernandes Ramos *et al.*, 2008).

Diante do alarmante aumento da resistência aos esquemas terapêuticos atualmente disponíveis, os avanços recentes no desenvolvimento de ensaios padronizados tornam-se essenciais, permitindo uma triagem eficiente de compostos ativos, sejam eles de origem natural ou sintética, acelerando o processo de identificação de novos candidatos a fármacos para combate da TB.

3 JUSTIFICATIVA

A TB continua sendo um dos maiores desafios de saúde pública do mundo, sendo uma das doenças infecciosas mais mortais e que ameaça a humanidade há milênios. Declarada como emergência mundial em 1995 pela OMS, atualmente o principal foco é buscar fim da doença até 2035. O Brasil está entre os 30 países prioritários, visto que mais de 80 mil pessoas por ano continuam a adoecer pela doença. A propagação da doença se dá em decorrência do tempo de exposição ao bacilo, das condições nutricionais e de saúde. Fatores como pobreza, situação de privação de liberdade, coinfeção pelo HIV, dificuldades de acesso ao tratamento e o tempo de tratamento favorecem a propagação da doença. Todos os fatores apontados contribuem em maior ou menor medida para o aumento no número de casos de TB causada por bactérias resistentes aos medicamentos, multirresistente a medicamentos (MDR) e extensivamente resistente a medicamentos (XDR), condições que continuam sendo grandes problemas de saúde pública em virtude do risco à saúde dos pacientes e da necessidade de utilizar medicamentos de segunda linha, mais tóxicos e com tempo de tratamento ainda mais longo (Deoghare, 2013; Schito *et al.*, 2015).

A descoberta de novos fármacos com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* é imperativa para o desenvolvimento de novas terapias. A necessidade de alternativas eficazes contra essa doença, especialmente diante dos desafios relacionados à adesão ao tratamento e ao surgimento de cepas bacterianas resistentes, evidencia a importância de investir em pesquisas para o desenvolvimento de novas estratégias de combate à bactéria. Tudo isso reforça a importância dos países aderirem efetivamente ao ODS 3 da OMS.

A busca por novos fármacos por meio da pesquisa de produtos naturais e compostos sintéticos é uma opção, pois os produtos naturais oferecem uma ampla variedade de estruturas químicas que podem auxiliar no descobrimento de um novo fármaco com, possivelmente, novos mecanismos de ação, além de estudos para viabilizar um menor período de tratamento gerando maior adesão do paciente (Pollo *et al.*, 2021).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicobacteriana *in vitro* de compostos sintéticos contra a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Realizar triagem de compostos sintéticos em relação à atividade antimicobacteriana *in vitro*.
- b. Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) dos compostos que apresentem função antimicobacteriana.
- c. Avaliar a concentração bactericida mínima (MBC) dos compostos triados.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 LOCAL DO ESTUDO

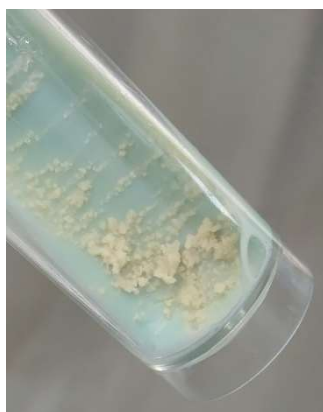
O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, do Centro de Ciências da Saúde (LBMMS/CCS/UFSC), localizado no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina.

5.1 CULTIVO DAS CEPAS DE MICOBACTÉRIAS

A cepa H37Rv foi descongelada e cultivada em meio sólido Ogawa-Kudoh pelo período de 28 dias em incubação de 37°C. Após esse período, as colônias da bactéria foram transferidas para tubo de vidro com tampa de rosca baquelite contendo pérolas de vidro em 5 ml de água estéril. A suspensão foi vigorosamente agitada em vórtex. Para garantir a segurança e permitir a decantação de aerossóis, a suspensão ficou 30 minutos em repouso antes de transferir para tubo Falcon contendo meio líquido 7H9 suplementado com com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC). As bactérias foram incubadas a 37°C até o crescimento atingir 1na escala de McFarland.

A cepa H37Ra foi fornecida pelo do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-SC), a bactéria foi cultivada em meio sólido Ogawa Kudoh e foi incubada em estufa por 28 dias a 37°C, como demonstrado na figura 5.

Figura 5 - Cultura de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Ra



Fonte: De autoria própria.

Após esse período de crescimento, as colônias da cepa H37Ra foram transferidas para em tubo de vidro com tampa de rosca baquelite contendo pérolas de vidro. Foram adicionados 5 ml de água de estéril ao tubo e a mistura foi submetida a agitação em vórtex para homogeneização. Considerando o risco de formação de aerossóis, foi realizado um período de repouso de 30 minutos após agitação para permitir a decantação dessas partículas para garantir a biossegurança.

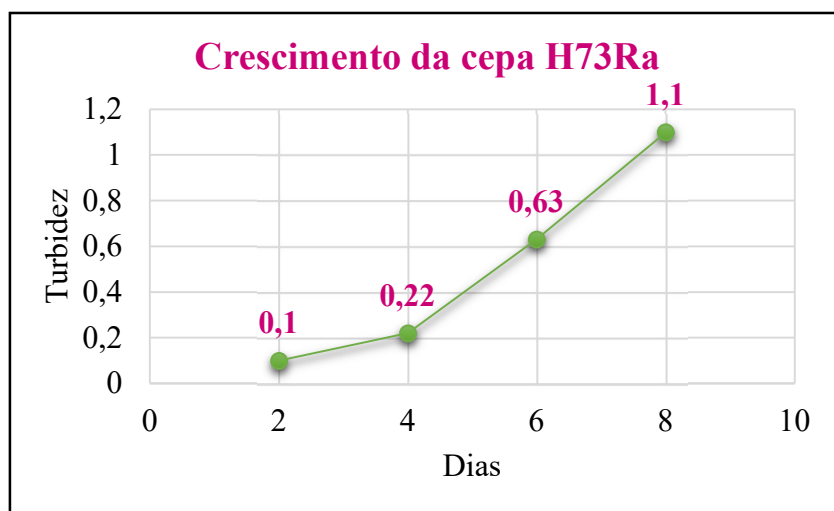
Posteriormente a suspensão bacteriana foi transferida para tubo Falcon contendo 15 ml de meio líquido 7H9 suplementado (OADC) e incubada a 37 °C até atingir a leitura de 1 na escala de McFarland. Para monitorar o crescimento bacteriano, foi realizada leitura em escala McFarland, utilizando o DensiCheck a cada dois dias como demonstrados na tabela 1 e gráfico 1.

Tabela 1 - Crescimento bacteriano

Dia	Turbidez
2	0,10
4	0,22
6	0,63
8	1,10

Fonte: De autoria própria.

Gráfico 1 - Crescimento da cepa H37Ra



Fonte: De autoria própria.

5.2 PREPARO DA RESAZURINA

O ensaio de resazurina é uma metodologia amplamente empregada para avaliação da viabilidade celular. Este teste baseia-se na capacidade da resazurina, um corante permeável à membrana celular, de ser reduzida pelas enzimas metabólicas presentes em células viáveis. Durante o processo, a resazurina, que possui coloração azul, é convertida em resorufina, um composto altamente fluorescente e de coloração rosa (Palomino *et al.*, 2002).

Este ensaio apresenta diversas vantagens notáveis em relação a outros métodos de avaliação de viabilidade, como os baseados em tetrazólio. Entre elas, destacam-se o baixo custo, a simplicidade de um formato homogêneo que minimiza etapas de lavagem e manipulação, e uma maior sensibilidade (Lilly *et al.*, [S.d.]).

Para o preparo da solução de resazurina, a 0,01%, pesou-se 0,01 g do reagente, que foi então adicionado a 100 ml de água ultrapura. A mistura foi homogeneizada por movimentos circulares até a completa dissolução da resazurina. Em seguida, a solução foi esterilizada por filtração, utilizando-se um filtro com poros de 0,22 μm . Após a esterilização, foram preparadas alíquotas que foram envoltas em papel alumínio e armazenadas em freezer -80°C, protegida da luz, com validade de 7 dias.

5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA ISONIAZIDA

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória mínima de INH com cepa H37Rv

Com o objetivo de validação do ensaio foi realizada a determinação da CIM. Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de INH na concentração de 1,6 mg/ml. Posteriormente, a placa descrita na figura 5, foi preparada com diluições seriadas do fármaco, abrangendo concentrações entre 8 e 0,03 $\mu\text{g/ml}$. Para manter a umidade e minimizar a evaporação durante a incubação, 200 μL de água foram adicionados aos poços laterais da placa. Em cada poço foram inseridos 100 μL de inóculo bacteriano, ajustado para 1 McFarland e diluído 1:20 (Wildner, 2016).

Os controles incluídos foram o controle positivo contendo apenas o inóculo bacteriano para garantir seu crescimento, e um controle negativo com meio 7H9 líquido sem inóculo bacteriano. A placa foi selada com Parafilm e incubada a 37 °C por sete dias. A adição de resazurina foi realizada no sétimo dia de incubação, e a leitura dos resultados ocorreu 24 horas após a sua adição. Poços com coloração rosa indicaram a presença de crescimento bacteriano, enquanto poços azuis demonstraram a inibição do crescimento.

Figura 6 - Mapa da placa para determinação de CIM de INH

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	INH 8	INH 4	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,06	INH 0,03	CP	O
O	INH 8	INH 4	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,06	INH 0,03	CP	O
O	INH 8	INH 4	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,06	INH 0,03	CP	O
O	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo de placa de 96 poços. O: água. CP: controle positivo. CN: Controle negativo.

Fonte: De autoria própria

5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória mínima de INH com cepa H37Ra

Visando a validação do teste, foi realizada a determinação da CIM de INH utilizando os mesmos métodos descritos no tópico 5.3.1. A placa foi selada com parafilme e incubada a 37 °C por sete dias. A avaliação foi realizada no oitavo dia pela coloração dos poços, sendo que a coloração rosa indica crescimento bacteriano e poços azuis confirmaram a inibição.

5.3.3 Coloração de Ziehl Neelsen

A fim de validar a eficácia INH e monitorar a presença de micobactérias viáveis, os poços tratados com este fármaco foram submetidos à coloração de Ziehl-Neelsen.

Foram pipetados 50 µL dos poços tratados em lâminas de microscopia. Após a secagem completa, dentro da cabine de segurança, a coloração foi iniciada com a aplicação de carbol fucsina. Para otimizar a penetração do corante na parede celular micobacteriana, as lâminas foram aquecidas até a emissão de vapores, repetindo este processo por até três vezes.

Após o aquecimento, as lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de fucsina. Em seguida, procedeu-se à descoloração com álcool-ácido, que foi aplicado até que não houvesse mais remoção de corante, as lâminas foram lavadas em água corrente.

Por fim, foi aplicado azul de metileno, deixando-o agir por 1 minuto. Após este período, as lâminas foram novamente lavadas com água corrente e deixadas secar até a realização da leitura.

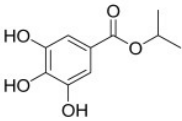
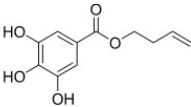
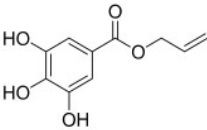
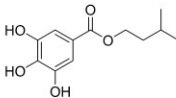
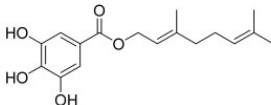
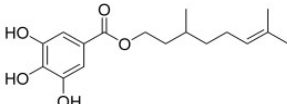
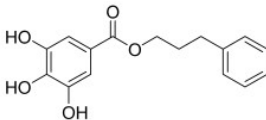
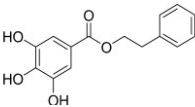
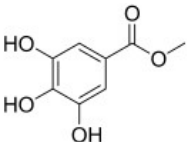
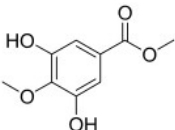
5.4 COMPOSTOS

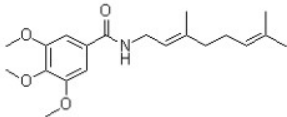
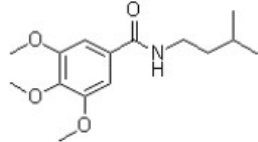
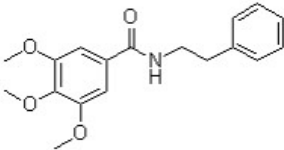
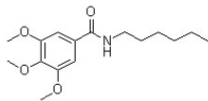
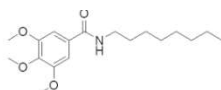
Vinte e seis compostos sintéticos para os ensaios *in vitro* foram sintetizados e obtidos do Departamento de Química em colaboração com o professor Dr. Louis Pergaud Sandjo, que são provenientes dos trabalhos das estudantes Dr. Gabriella Barroso Souza e Otília Hoeller Guarnieri.

A tabela 2 traz as informações de 15 compostos que tiveram como referência a estrutura do ácido gálico. Esses compostos são provenientes do extrato da folha e caule da *Mangifera indica*, com modificação na estrutura realizada pelos pesquisadores. A etapa de purificação foi realizada utilizando a cromatografia em coluna de adsorção, demonstrado na figura 7. Esses compostos também foram submetidos a ensaios contra enzimas virais MPro e NS2B-NS3, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*.

A tabela 3 demonstra 11 compostos provenientes do estudo com foco na síntese de aminas através da condenação de Schiff. Esses compostos foram submetidos a testes biológicos contra enzima NS2B-NS3, Mpro, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*.

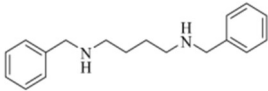
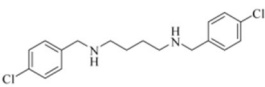
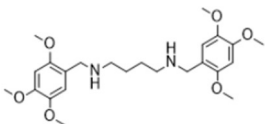
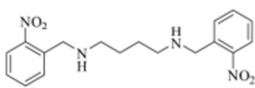
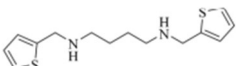
Tabela 2 - Compostos sintéticos provenientes do ácido gálico

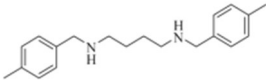
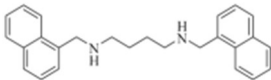
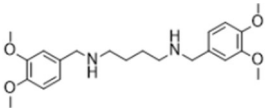
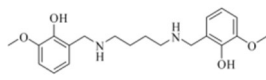
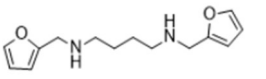
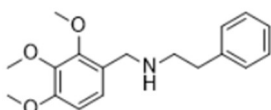
Código	Estrutura	Peso molecular	Peso	LogP
EAG-1		212,19 g.mol ⁻¹	2 mg	1,59
EAG-3		224,21 g.mol ⁻¹	8 mg	1,76
EAG-4		210,18 g.mol ⁻¹	2 mg	1,49
EAG-6		240,25 g.mol ⁻¹	2 mg	2,5
EAG-7		306,35 g.mol ⁻¹	12 mg	4,37
EAG-9		308,36 g.mol ⁻¹	7,8 mg	4,32
EAG-10		288,29 g.mol ⁻¹	10,4 mg	3,17
EAG-12		274,26 g.mol ⁻¹	1,6 mg	2,65
GM		184,14 g.mol ⁻¹	5,7 mg	0,85
AGP (16-31)		198,17 g.mol ⁻¹	5,7 mg	1,12

AM-2		347,44 g.mol ⁻¹	22 mg	3,56
AM-3		281,34 g.mol ⁻¹	3,0 mg	2,37
AM-4		315,36 g.mol ⁻¹	5,4 mg	2,81
AM-5		295,37 g.mol ⁻¹	3 mg	2,87
AM-6		323,42 g.mol ⁻¹	7,9 mg	3,71

LogP: coeficiente de partição.

Tabela 3 Compostos sintéticos provenientes de aminas

Código	Estrutura	Peso molecular	Peso	LogP
HTG-0-R		268,19 g.mol ⁻¹	8,1 mg	3,22
HTG-1-R		336,12 g.mol ⁻¹	5,4 mg	4,58
HTG-7-R		448,26 g.mol ⁻¹	3,5 mg	2,48
HTG-9-R		358,16 g.mol ⁻¹	3,7 mg	3,04
HTG-11-R		280,11 g.mol ⁻¹	5,3 mg	3,02

HTG-12-R		293,23 g.mol ⁻¹	6,1 mg	4,12
HTG-14-R		368,23 g.mol ⁻¹	4,9 mg	5,54
HTG-17-R		388,24 g.mol ⁻¹	6,5 mg	2,86
HTG-18-R		360,20 g.mol ⁻¹	5,2 mg	2,23
HTG-21-R		248,15 g.mol ⁻¹	4,9 mg	1,74
IMG-4R		301,17 g.mol ⁻¹	4,1 mg	3,13

LogP: coeficiente de partição.

Figura 7 Cromatografia em coluna de adsorção



Fonte: De autoria própria.

5.5 DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos foram diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) como demonstrado na figura 8, atingindo uma concentração final de 10 mg/ml, conforme detalhado na tabela 4. As

soluções foram aliquotadas em tubos Eppendorf estéreis de 0,5 ml e armazenados em freezer - 20°C até o uso.

Tabela 4 - Diluição dos compostos

COMPOSTO	PESO	DMSO
EAG-1	2 mg	0,200 ml
EAG-3	8 mg	0,800 ml
EAG-4	2 mg	0,200 ml
EAG-6	2 mg	0,200 ml
EAG-7	12 mg	1,2 ml
EAG-9	7,8 mg	0,780 ml
EAG-10	10,4 mg	1,04 ml
EAG-12	1,6 mg	0,16 ml
GM	5,7 mg	0,570 ml
AGP (16-31)	5,7 mg	0,570 ml
AM-2	22 mg	2,2 ml
AM-3	3 mg	0,300 ml
AM-4	5,4 mg	0,540 ml
AM-5	3 mg	0,300 ml
AM-6	7,9 mg	0,790 ml
HTR-0-R	8,1 mg	0,810 ml
HT-1-R	5,4 mg	0,54 ml
HTG-7-R	3,5 mg	0,35 ml
HTG-9-R	3,7 mg	0,37 ml
HTG-11-R	5,3 mg	0,53 ml
HTR-12-R	6,1 mg	0,61 ml
HTG-14-R	4,9 mg	0,49 ml
HTG-17-R	6,5 mg	0,65 ml
HTG-18-R	5,2 mg	0,52 ml
HTG-21-R	4,9 mg	0,48 ml
IMG-4R	4,1 mg	0,41 ml
HTR-12-R	6,1 mg	0,61 ml
HTG-14-R	4,9 mg	0,49 ml
HTG-17-R	6,5 mg	0,65 ml

Fonte: De autoria própria.

Figura 8 Alíquota do composto diluído em DMSO



Fonte: De autoria própria.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA IN VITRO

5.6.1 TRIAGEM DOS COMPOSTOS

Os compostos foram submetidos a triagem para determinação da atividade antimicobacteriana *in vitro* na concentração de 100 µg/ml. Para isso foram descongeladas as alíquotas dos compostos, previamente armazenados em tubos Eppendorf estéreis.

O experimento foi conduzido utilizando a metodologia de ensaio de microplaca com resazurina REMA(Palomino *et al.*, 2002). Para determinar a atividade antimicobacteriana foi utilizada uma placa de 96 poços. Nos poços externos, pipetou-se 200 µl de água estéril para assegurar a umidade minimizar a evaporação das bordas.

Os compostos foram preparados com o dobro da concentração final desejada, considerando posteriormente a adição da suspensão bacteriana. Inicialmente foi preparada uma solução de 6 µl do composto em 294 µl de 7H9 suplementado com OADC. Em seguida, nos poços da placa designados para os compostos, foram adicionados 100 µl dos compostos na concentração 200 µg/ml, juntamente com 100 µl do inóculo bacteriano na escala de 1 McFarland diluído 1:20.

A Concentração Inibitória Mínima a INH foi feita em paralelo como tentativa de validar os resultados da triagem. Foram pipetados 24µl da solução mãe do fármaco em 276µl de 7H9, dessa solução realizou-se uma diluição seriada. No primeiro poço da placa foram adicionados 200 µl de INH na concentração de 8 µg/ml e transferidos sequencialmente 100 µl para os poços subsequentes realizando a diluição seriada. Os mapas das placas utilizadas nesse ensaio estão demonstrados nas figuras 9, 10 e 11.

As placas foram seladas com parafilme e incubadas pelo período de 7 dias a 37°C. Após foi realizada a adição da Resazurina, sendo 30 µl em cada poço e realizada leitura após 24 horas. Os testes foram realizados em triplicatas técnica e biológica.

Figura 9 Mapa da placa 01

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	EAG-1	EAG-3	EAG-4	EAG-6	EAG-7	EAG-9	EAG-10	EAG-12	GM	AGP (16-31)	O
O	EAG-1	EAG-3	EAG-4	EAG-6	EAG-7	EAG-9	EAG-10	EAG-12	GM	AGP (16-31)	O
O	EAG-1	EAG-3	EAG-4	EAG-6	EAG-7	EAG-9	EAG-10	EAG-12	GM	AGP (16-31)	O
O	AM-2	AM-3	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	AM-2	AM-3	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	AM-2	AM-3	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo de placa de 96 poços. O: água. CP: controle positivo. CN: Controle negativo.

Fonte: De autoria própria.

Figura 10 Mapa da placa 02

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	AM-4	AM-5	AM-6	HTG-0-R	HTG-1-R	HTG-7-R	HTG-9-R	HTG-11-R	HTG-17-R	HTG-18-R	O
O	AM-4	AM-5	AM-6	HTG-0-R	HTG-1-R	HTG-7-R	HTG-9-R	HTG-11-R	HTG-17-R	HTG-18-R	O
O	AM-5	AM-5	AM-6	HTG-0-R	HTG-1-R	HTG-7-R	HTG-9-R	HTG-11-R	HTG-17-R	HTG-18-R	O
O	HTG-21-R	HTG-12-R	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	HTG-21-R	HTG-12-R	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	HTG-21-R	HTR-12-R	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo de placa de 96 poços. O: água. CP: controle positivo. CN: Controle negativo.

Fonte: De autoria própria.

Figura 11 Mapa da placa 03

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	HTG-14-R	IMG-4R	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	HTG-14-R	IMG-4R	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	HTG-14-R	IMG-4R	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CN	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo de placa de 96 poços. O: água. CP: controle positivo. CN: Controle negativo.

Fonte: De autoria própria.

5.6.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Os compostos que demonstraram atividade antimicobacteriana na etapa de triagem foram submetidos aos testes de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Este teste foi realizado utilizando o ensaio de microplaca, empregando sete concentrações dos compostos sendo elas 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,56 µg/ml e 1,56 µg/ml.

Em placa de 96 poços foram adicionados os compostos preparados novamente com o dobro da concentração final, adicionando 6,0 µl do composto diluído em DMSO em 294 µl de 7H9 suplementando. Em seguida foram adicionados 200 µl ao primeiro poço e realizada diluição seriadas até o sétimo poço, descartando os 100 µl finais.

Após a diluição dos compostos, 100 µl do inóculo bacteriano, diluído 1:20, foram adicionados em todos os poços que continham os compostos. Como controles de validação do ensaio controle positivo foi definido como o inóculo bacteriano e controle negativo apenas o meio 7H9 suplementado. Nesse experimento seis poços foram utilizados para determinação da concentração inibitória mínima de INH usando o mesmo protocolo descrito no tópico 5.3.1. As figuras 12, 13, 14 e 15 demonstram o mapa das placas.

As placas foram seladas com parafilme e incubadas pelo período de 7 dias em estufa a 37°C, no sétimo dia foi adicionado 30 µl de resazurina em cada poço e realizada a leitura após 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano, impedindo a mudança de cor de azul para rosa. Os testes foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas.

Figura 12 Mapa da placa 01 determinação da CIM

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	EAG-12 100	EAG-12 50	EAG-12 25	EAG-12 12,5	EAG-12 6,25	EAG-12 3,125	EAG-12 1,56	EAG-12 100	EAG-12 50	EAG-12 25	O
O	EAG-12 12,5	EAG-12 6,25	EAG-12 3,125	EAG-12 1,56	EAG-12 100	EAG-12 50	EAG-12 25	EAG-12 12,5	EAG-12 6,25	EAG-12 3,125	O
O	EAG-12 1,56	GM 100	GM 50	GM 25	GM 12,5	GM 6,25	GM 3,125	GM 1,56	GM 100	GM 50	O
O	GM 25	GM 12,5	GM 6,25	GM 3,125	GM 1,56	GM 100	GM 50	GM 25	GM 12,5	GM 6,25	O
O	GM 3,125	GM 1,56	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CP	O
O	CN	CN	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	CP	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo de placa de 96 poços. As concentrações do composto e do fármaco estão representadas em cada poço. O: água. CP: controle positivo, CN: Controle negativo. Fonte: De autoria própria.

Figura 13 Mapa da placa 02 placa determinação da CIM

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	HTG1 R 100	HTG1 R 50	HTG1 25	HTG1R 12,5	HTG1 R 6,25	HTG1 R 3,125	HTG1R 1,56	HTG1 R 100	HTG1 R 50	HTG1 R 25	O
O	HTG1 R 12,5	HTG1 R 6,25	HTG1 R 3,125	HTG1R 1,56	HTG1 R 100	HTG1 R 50	HTG1R 25	HTG1 R 12,5	HTG1 R 6,25	HTG1 R 3,125	O
O	HTG1 R 1,56	HTG9 R 100	HTG9 R 50	HTG9R 25	HTG9 R 12,5	HTG9 R 6,25	HTG9R 3,125	HTG9 R 1,56	HTG9 R 100	HTG9 R 50	O
O	HTG9 R 25	HTG9 R 12,5	HTG9 R 6,25	HTG9R 3,125	HTG9 R 1,56	HTG9 R 100	HTG9R 50	HTG9 R 25	HTG9 R 12,5	HTG9 R 6,25	O
O	HTG9 R 3,125	HTG9 R 1,56	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	O	CP	O
O	CN	CN	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	O	CP	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo de placa de 96 poços. As concentrações do composto e do fármaco estão representadas em cada poço. O: água. CP: controle positivo, CN: Controle negativo. Fonte: De autoria própria.

Figura 14 Mapa da placa 03 para determinação da CIM

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	HTG12 R 100	HTG12 R 50	HTG12 R 25	HTG12 R 12,5	HTG12 R 6,25	HTG12 R 3,125	HT12 R 1,56	HTG12 R 100	HTG12 R 50	HTG12 R 25	O
O	HTG12 R 12,5	HTG12 R 6,25	HTG12 R 3,125	HTG12 R 1,56	HTG12 R 100	HTG12 R 50	HT12 R 25	HTG12 R 12,5	HTG12 R 6,25	HTG12 R 3,125	O
O	HTG12 R 1,56	HTG14 R 100	HTG14 R 50	HTG14 R 25	HTG14 R 12,5	HTG14 R 6,25	HT14 R 3,125	HTG14 R 1,56	HTG14 R 100	HTG14 R 50	O
O	HTG14 R 25	HTG14 R 12,5	HTG14 R 6,25	HTG14 R 3,125	HTG14 R 1,56	HTG14 R 100	HT14 R 50	HTG14 R 25	HTG14 R 12,5	HTG14 R 6,25	O
O	HTG14 R 3,125	HTG14 R 1,56	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	O	CP	O
O	CN	CN	INH 2	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	O	CP	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo de placa de 96 poços. As concentrações do composto e do fármaco estão representadas em cada poço. O: água. CP: controle positivo, CN: Controle negativo. Fonte: De autoria própria.

Figura 15 Mapa da placa 04 para determinação da CIM

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	IMG4 R 100	IMG4 R 50	IMG4 R 25	IMG4 R 12,5	IMG4 R 6,25	IMG4 R 3,125	IMG4 R 1,56	IMG4 R 100	HT12R 50	IMG4 R 25	O
O	IMG4 R 12,5	IMG4 R 6,25	IMG4 R 3,125	IMG4 R 1,56	IMG4 R 100	IMG4 R 50	IMG4 R 25	IMG4 R 12,5	IMG4 R 6,25	IMG4 R 3,125	O
O	IMG4 R 1,56	CN	CN	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	O	O
O	CN	CN	CN	INH 1	INH 0,5	INH 0,25	INH 0,125	INH 0,0625	CP	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo de placa de 96 poços. As concentrações do composto e do fármaco estão representadas em cada poço. O: água. CP: controle positivo, CN: Controle negativo. Fonte: De autoria própria.

5.6.3 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Para a determinação da CBM, foi utilizado o meio sólido 7H10 suplementado com OADC e glicerol, preparado no laboratório, como demonstrado na figura 16. Para realização destes testes em duplicata foram preparados 2 litros de meio 7H10 resultando em 98 placas, demonstradas na figura 17.

Figura 16 Preparação do meio 7H10



Fonte: De autoria própria

Figura 17 Placas com meio sólido 7H10



Fonte: De autoria própria

Os compostos que apresentaram atividade inibitória na etapa de CIM, foram submetidos aos ensaios de CBM. Todas as concentrações que exibiram inibição de crescimento, indicado pela coloração azul no ensaio de resazurina, e a primeira concentração apresentando crescimento bacteriano, com coloração rosa ou arroxeada, foram submetidas a diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} e inoculadas em meio 7H10.

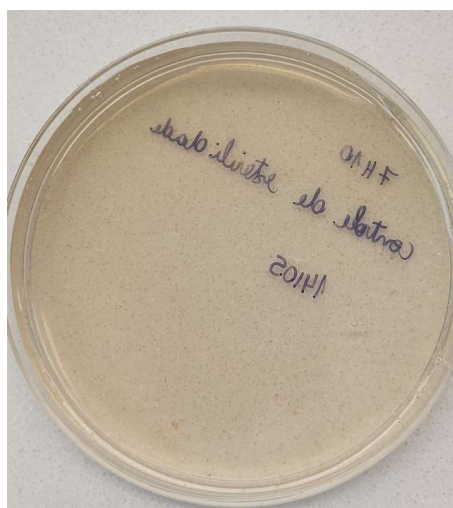
Para o processo de diluição, foram selecionados microtubos contendo 450 μ l de PBS (Phosphate-Buffered Saline). A partir dos poços da placa de CIM que apresentaram inibição, retiraram-se 50 μ L da suspensão e transferiram-se para o primeiro microtubo, realizando a diluição seriada até o sétimo microtubo.

Em seguida as placas foram divididas em quatro quadrantes foram identificadas com o nome do composto, concentração, diluição e inóculo puro. No inóculo puro foram retirados do poço da placa 50 μ l e pipetados no quadrante de inóculo puro indicado na placa com o meio

sólido 7H10. Posteriormente, foram pipetados 50 µl de cada uma das diluições em seus quadrantes específicos.

Para assegurar a esterilidade do meio 7H10, uma placa contendo apenas o meio, sem adição de inóculo bacteriano ou composto, foi incubada simultaneamente, demonstrado na figura 20. Para verificar a viabilidade do inóculo e o crescimento bacteriano na ausência de inibidores, 50 µL da suspensão do poço de controle positivo foram submetidos a diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} . Desse modo, 50 µL do inóculo puro e 50 µL de cada uma das diluições seriadas foram pipetados em quadrantes de placas com meio 7H10 sólido.

Figura 18 Placa de controle de esterilidade



Fonte: De autoria própria

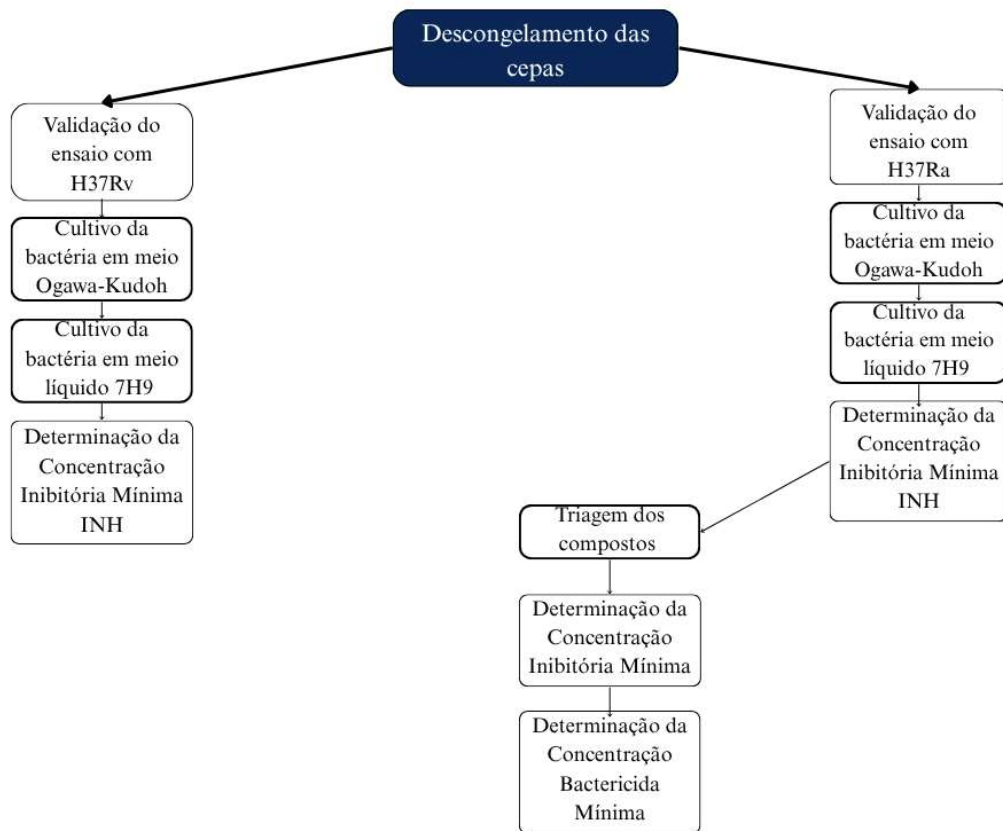
Todas as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por um período de 28 dias. Os testes foram realizados em duplicata técnica e biológica para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

A CBM foi definida como a menor concentração do composto em que houve redução do crescimento bacteriano $\geq 99,9\%$ (Qaiyumi, 2007). Os extratos e compostos isolados foram considerados bactericidas quando a relação MBC/MIC foi <4 (Pankey; Sabath, 2004).

5.7 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA

A figura 19 demonstra um fluxograma com o resumo da metodologia aplicadas no desenvolvimento do projeto.

Figura 19 Fluxograma da metodologia do projeto



Fonte: De autoria própria

6 RESULTADOS

6.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA ISONIAZIDA

Foram realizadas três tentativas de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da isoniazida (INH) para validação do método de determinação da CIM utilizando resazurina como indicador de viabilidade celular. Ao testar INH frente à cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, todos os poços indicavam crescimento bacteriano, inviabilizando a determinação da CIM e a validação do método. Com o objetivo de investigar a presença de contaminantes nas placas, foram preparadas lâminas para coloração de Ziehl Neelsen. A presença de micobacterias foi confirmada em todas as lâminas com a presença de bacilos álcool-ácido resistentes, e contaminantes não foram observados. Considerou-se então a possibilidade de resistência da cepa H37Rv do laboratório, que já era antiga e havia sido submetida a múltiplas passagens. Como alternativa, a cepa de H37Ra foi obtida junto ao LACEN para ser utilizada nos ensaios.

O mesmo experimento utilizando a metodologia de ensaio de microplaca com resazurina (REMA) foi realizado com a cepa H37Ra. A CIM de INH foi determinado em 0,25 µg/ml.

6.1 MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEH NEELSEN

A fim de verificar se o crescimento indicado pela coloração rosa foi de *Mycobacterium tuberculosis* ou se havia outras bactérias contaminantes, os poços tratados fármaco foram submetidos à coloração de Ziehl-Neelsen. Essa análise microscópica revelou a presença de bacilos álcool-ácido resistentes demonstrados na figura 20.

Figura 20 Lâmina de *Mycobacterium tuberculosis*

Crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*.
 Fonte: De autoria própria

6.2 ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA IN VITRO

Os resultados demonstraram que, dentre os 26 compostos avaliados na etapa de triagem, os compostos HTG-1-R, HTG-9-R, HTG-12-R, HTG-14-R e IMG-4R apresentaram ação frente à cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Todos são compostos sintéticos provenientes de aminas.

Os 5 compostos ativos identificados na etapa de triagem foram então submetidos ao ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A concentração inibitória mínima de cada um dos compostos testados está demonstrada na tabela 5.

Tabela 5 CIM dos compostos

Composto	CIM $\mu\text{g/ml}$ (μM) <i>M.tuberculosis</i>
HTG-1-R	6,25
HTG-9-R	25
HTG-12-R	25
HTG-14-R	6,25
IMG-4-R	50

CIM: Concentração inibitória mínima.

As concentrações que demonstraram inibição do crescimento bacteriano no ensaio de Concentração Inibitória Mínima foram submetidas ao teste de Concentração Bactericida Mínima. Para isso, os inóculos correspondentes à CIM e às concentrações superiores foram

subcultivados em meio sólido 7H10 suplementado. Para a avaliação da CBM, esses compostos foram incubados em placas de meio sólido 7H10, tanto com o inóculo puro quanto em diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} , como demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 Compostos e concentrações utilizados para testes de CBM frente *Mycobacterium tuberculosis*

Composto	Concentração
HTG-1-R	100 µg/ml
HTG-1-R	50 µg/ml.
HTG-1-R	25 µg/ml
HTG-1-R	12.5 µg/ml
HTG-1-R	6.25 µg/ml
HTG-9-R	100 µg/ml
HTG-9-R	50 µg/ml.
HTG-9-R	25 µg/ml
HTG-9-R	12.5 µg/ml
HTG-12-R	100 µg/ml
HTG-12-R	50 µg/ml.
HTG-12-R	25 µg/ml
HTG-14-R	100 µg/ml
HTG-14-R	50 µg/ml.
HTG-14-R	25 µg/ml
HTG-14-R	12.5 µg/ml
HTG-14-R	6.25 µg/ml
IMG-4R	100 µg/ml
IMG-4R	50 µg/ml.

Fonte: De autoria própria

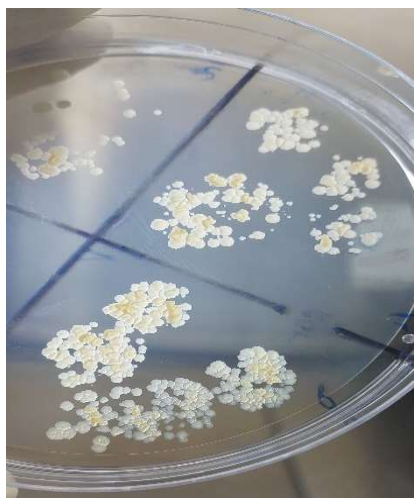
Com o objetivo de avaliar o crescimento bacteriano nas concentrações que não foram inibidas no ensaio de resazurina (indicadas pela coloração rosa), foram plaqueadas os compostos como demonstrado na figura 21 e as concentrações indicadas na tabela 7.

Tabela 7 Concentrações dos compostos que não inibiram crescimento

HTG-1-R	3,125 µg/ml
HTG-9-R	12,5 µg/ml
HTG-12-R	12,5 µg/ml
HTG-14-R	3,125 µg/ml
IMG-4R	25 µg/ml

Fonte: De autoria própria

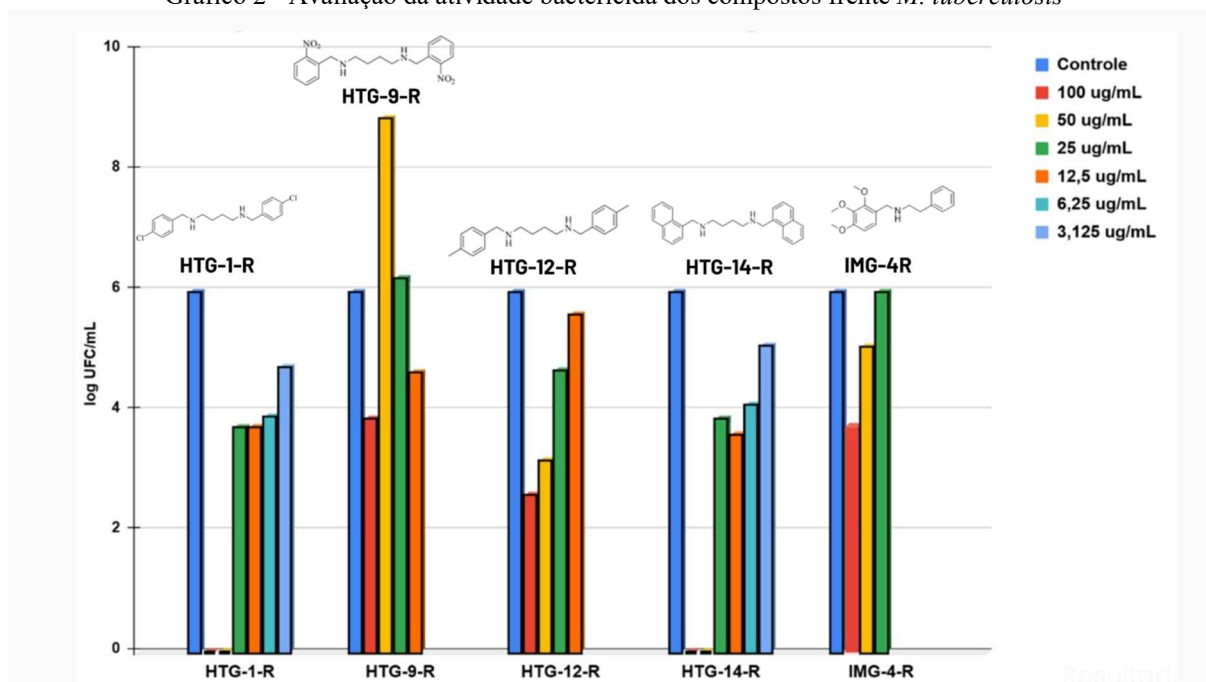
Figura 21 Colônias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio sólido 7H10



Fonte: De autoria própria

Os cinco compostos apresentaram atividade bactericida frente a *M. tuberculosis*, após 7 dias de tratamento, com os resultados demonstrados no gráfico 2. Essas concentrações os compostos foram capazes de reduzir a quantidade de bactérias em 99,9%. Os compostos HTG-12-R, HTG-14-R e IMG-4-R apresentam CBM correspondentes a 2XCIM, já o composto HTG-9-R 4x CIM e o composto HTG-1-R na mesma concentração da MIC.

Gráfico 2 - Avaliação da atividade bactericida dos compostos frente *M. tuberculosis*



Quantificação de UFC em meio 7H10, após tratamento de *M. tuberculosis* com os compostos HTG-1-R, HTG-9-R, HTG-12-R, HTG-14-R, IMG-4-R, demonstrados nas estruturas químicas. Cada coluna representa as UFC/ml. Controle: inóculo bacteriano sem tratamento. UFC: unidades formadoras de colônias.

Fonte: De autoria própria.

7 DISCUSSÃO

A TB permanece como um grave desafio de saúde global, agravado pelos alarmantes índices de resistência e multirresistência aos medicamentos atualmente utilizados. A complexidade do tratamento caracterizada pela longa duração, efeitos tóxicos associados e pelos elevados custos dos medicamentos, intensificando a necessidade de desenvolver novos fármacos, por isso nesse cenário a pesquisa por compostos inovadores se torna essencial para combater essa doença.

Apesar dos compostos naturais serem uma fonte valiosa para descoberta de novos medicamentos, o baixo rendimento e propriedades físico-química desfavoráveis dificulta esse processo de obtenção, por isso atualmente o principal foco são os análogos sintéticos com propriedades farmacológicas aprimoradas.

Destaca-se que nesse estudo os compostos que apresentaram ação contra *Mycobacterium tuberculosis* eram provenientes da síntese de aminas. As aminas constituem uma classe fundamental de compostos orgânicos, caracterizadas pela presença de pelo menos um átomo de nitrogênio orgânico em sua estrutura. A versatilidade dessas moléculas reside na forma como esse nitrogênio se liga a outros grupos. Dependendo do número de grupos alquila ou arila conectados ao nitrogênio, as aminas podem ser classificadas em primárias, secundárias ou terciárias. Há também casos em que o nitrogênio se liga a quatro grupos, resultando em uma carga positiva e formando um sal de amônio ou amina quaternária. A natureza desses grupos também permite outra classificação: aminas são alifáticas quando todos os grupos ligados ao nitrogênio são alquilas, e aromáticas quando pelo menos um dos grupos é um arila. Além de sua relevância química e industrial, várias aminas são produzidas por plantas e animais, apresentando as mais diversas propriedades fisiológicas. Exemplos notáveis incluem a putrescina e a cadaverina, que são produzidas pela decomposição de proteínas, destacando a presença ubíqua e a importância biológica dessa classe de compostos (Vinícius; Gurgel, [s.d.]).

A pesquisa focada em derivados de aminoácidos e aminas tem se mostrado promissora na busca por novos agentes anticâncer. Além disso, as aminas biogênicas, presentes em diversos organismos, possuem características fisiopatológicas variadas, o que as torna de particular interesse na área da Química Medicinal (Angeli et al., 2021).

Um estudo realizado avaliou a atividade antimicobacteriana, o sinergismo e o mecanismo de ação de novas aminas policíclicas contra *M. tuberculosis*. Os pesquisadores observaram que os compostos demonstraram atividade sinérgica com a espectinomicina, um substrato conhecido da bomba de efluxo. Essa sinergia aponta para uma possível inibição da bomba de efluxo, um mecanismo importante para contornar a resistência bacteriana.

Adicionalmente, um dos compostos inibiu *M. tuberculosis* H37Rv, qualificando-o como um composto líder para o desenvolvimento de agentes antimicobacterianos mais seletivos e potentes (Kapp et al., 2021).

As aminas e seus derivados também exibem atividade antifúngica e antibacteriana contra outros patógenos. Um estudo de 2008, que investigou a síntese e avaliação farmacológica *in vitro* de aminas derivadas do limoneno, testou esses compostos contra *S. aureus* e também observou não apenas atividade antifúngica, mas também atividade anti-leishmania (Graebin, Cedrick, 2008)

A aplicabilidade das aminas se estende aos compostos de amônio quaternário que são potentes antimicrobianos utilizados para prevenir a disseminação de bactérias patogênicas. A ação do cloreto de benzalcônio, um composto de amônio quaternário amplamente empregado, foi caracterizada contra o patógeno *Acinetobacter baumannii*, atuando principalmente por meio de danos à membrana celular. Isso abre novas perspectivas para o desenvolvimento de antibióticos e o tratamento de bactérias multirresistentes, reforçando o vasto potencial das aminas na busca por novas estratégias antimicrobiana (Knauf et al., 2018)

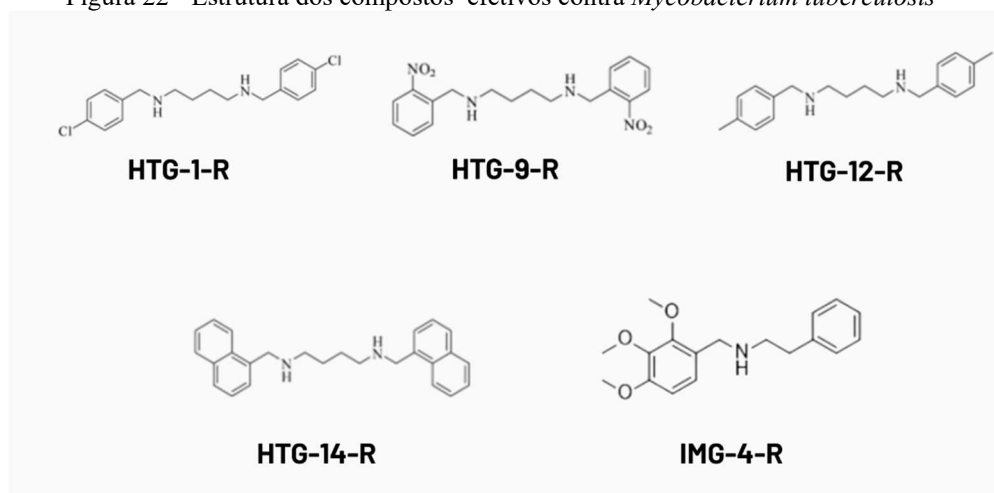
No presente estudo, os compostos HTG-1-R, HTG-14-R, HTG-12-R, IMG-4-R e HTG-9-R todos derivados sintéticos de aminas, demonstraram atividade inibitória e bactericida. Estes compostos foram testados pela primeira vez contra *M. tuberculosis* cepa H37Ra, evidenciando seu potencial como candidatos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Para avançar na caracterização desses compostos, é necessário a realização de ensaios complementares, incluindo testes de citotoxicidade para avaliação da segurança, cálculo do índice de seletividade para determinar a especificidade antimicobacteriana, análise da curva de tempo de morte bacteriana para compreender a cinética de ação, além da avaliação da eficácia frente a isolados clínicos e a investigação do mecanismo de ação.

8 CONCLUSÃO

Os resultados mostrados neste trabalho fornecem evidências de potenciais novos agentes antimicobacterianos. A avaliação *in vitro* de 26 compostos sintéticos contra a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra permitiu identificar cinco compostos promissores: HTG-1-R, HTG-14-R, HTG-12-R, IMG-4-R e HTG-9-R, com suas estruturas demonstradas na figura 22.

Figura 22 - Estrutura dos compostos efetivos contra *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: De autoria própria

A determinação das concentrações inibitórias mínimas e das concentrações bactericidas mínimas demonstrou atividade importante frente à cepa H37Ra. As CIMs foram estabelecidas em 6,25 µg/ml para o composto HTG-1-R, 6,25 µg/ml para HTG-14-R, 25 µg/ml para HTG-9-R, 25 µg/ml para HTG-12-R, e 50 µg/ml para IMG-4-R.

Em relação às CBMs, observou-se que os compostos HTG-12-R, HTG-14-R e IMG-4-R apresentaram CBMs correspondentes a 2 vezes a CIM, o composto HTG-9-R demonstrou uma CBM de 4 vezes a CIM, enquanto o composto HTG-1-R se destacou por ter sua CBM na mesma concentração da CIM, sugerindo que esse composto possa ser promissor, visto que é capaz de eliminar a bactéria na mesma concentração em que inibe seu crescimento.

Esses achados são de extrema relevância no contexto da crescente necessidade de novas terapias para combater a TB, especialmente diante dos desafios de resistência aos fármacos existentes. A identificação de compostos com atividade antimicobacteriana *in vitro* e com perfis de CBM tão distintos e promissores representa um passo fundamental no desenvolvimento de novos medicamentos.

Com base nos ensaios realizados, é possível inferir que os compostos HTG-1-R, HTG-14-R, HTG-12-R, IMG-4-R e HTG-9-R são candidatos promissores e justificam a continuidade dos estudos. Recomenda-se a realização de ensaios complementares para aprofundar a

compreensão de seu perfil farmacológico e toxicológico, elucidação dos mecanismos de ação e avaliação em cepas multirresistentes e modelos *in vivo*. Este trabalho, portanto, estabelece uma base para futuras investigações na busca por novos e eficazes fármacos contra a TB.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, Bodhraj *et al.* **Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis***. *Molecular Biology Reports* Springer, , 1 maio 2020.
- ALSAYED, Shahinda S. R.; GUNOSEWOYO, Hendra. **Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug Targets**. *International Journal of Molecular Sciences* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2023.
- ANGALA, Shiva Kumar *et al.* **The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis***. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* Informa Healthcare, , 1 set. 2014.
- ANGELI, A. et al. Amine- and Amino Acid-Based Compounds as Carbonic Anhydrase Activators. *Molecules*, v. 26, n. 23, p. 7331, 2 dez. 2021.
- BALEPUR, Shyam S.; SCHLOSSBERG, David. Hematologic Complications of Tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 6, 23 dez. 2016.
- BIGI, M. M. et al. An update on *Mycobacterium tuberculosis* lipoproteins. *Future microbiology*, 14 nov. 2023.
- BORN, Jan *et al.* **Night-time Plasma Cortisol Secretion is Associated with Specific Sleep Stages**. [S.l.: S.n.].
- BRASIL (2025). **Boletim Epidemiológico - Tuberculose 2025**. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Brasília. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2025/boletim-epidemiologico-tuberculose-2025/>
- BRASIL (2022). **Manual de recomendações para o diagnóstico laboratorial de tuberculose e micobactérias não tuberculosas de interesse em saúde pública no Brasil**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. 1. ed. Brasília. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/publicacoes/2022/manual-diagnostico-laboratorial-de-tb-e-micobacterias-nao-tuberculosas-no-brasil_22.pdf/view
- BRASIL (2022b) . **Nota informativa Recomendações para a utilização do teste rápido LF-LAM**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/NOTA-TECNICA-Recomendacoes-para-a-utilizacao-do-teste-rapido-LF-LAM-14_07_2023.pdf.pdf>.
- BRASIL (2020b). **Relatório de recomendação Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde**. Brasília. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt.br/midias/consultas/relatorios/2020/relatorio_cp_culturaliquida_tuberculose_18_2020.pdf
- BRASIL (2014). **Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica**. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 1. ed. Brasília. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tuberculose/publicacoes/tecnicas-de-aplicacao-e-leitura-da-prova-tuberculinica.pdf/view>

BRASIL, (2020) **Teste de liberação interferon-gama para detecção de tuberculose latente em pacientes imunocomprometidos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. BRASIL (2014). Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 1. ed. Brasília. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-54-br/midias/consultas/relatorios/2020/sociedade/resoc222> interferon-gama_tuberculose_latente.

BUYUKOGLAN, Hakan *et al.* Leptin levels in various manifestations of pulmonary tuberculosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, 2007.

CEPHEID. **Trademark, Patents and Copyright Statements**. 2020. Disponível em: <https://www.cephheid.com/content/dam/wwwcephheid-com/documents/package-insert-files/Xpert-MTB-RIF-SPANISH-Package-Insert-301-1404-ES-Rev-G.pdf>

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Testing for Tuberculosis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tb/testing/index.html>>.

CHAI, Qiyao; ZHANG, Yong; LIU, Cui Hua. **Mycobacterium tuberculosis: An adaptable pathogen associated with multiple human diseases**. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Media S.A., , 15 maio 2018.

CHANG, Suzanne W. *et al.* Gut Hormones, Appetite Suppression and Cachexia in Patients with Pulmonary TB. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 30 jan. 2013.

CHIARADIA, Laura *et al.* Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Amide Local Anesthetics. [Updated 2017 Jul 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547905/> CUI, Zelin *et al.* Complex sputum microbial composition in patients with pulmonary tuberculosis. **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.

DE MORAIS, Mayara Castro *et al.* Cytotoxic and antifungal amides derived from ferulic acid: Molecular docking and mechanism of action. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

DEOGHARE, Shashank. **Bedaquiline: A new drug approved for treatment of multidrug-resistant tuberculosis**. **Indian Journal of Pharmacology**, set. 2013.

FEDRIZZI, Tarcisio *et al.* Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. **Scientific Reports**, v. 7, 27 mar. 2017.

FERNANDES RAMOS, Daniela *et al.* Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. [S.l.: S.n.].

FEYISA, Degaga Wolde *et al.* **Weak Localization of Radiographic Manifestations in Pulmonary Tuberculosis from Chest X-ray: A Systematic Review.** *Sensors* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 ago. 2023.

FOR DISEASE CONTROL, Centers. **Tuberculin Skin Testing What is it? How is the TST Administered? How Are TST Reactions Interpreted? Classification of the Tuberculin Skin Test Reaction.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/infectioncontrol.html>.

FU, Jian *et al.* Synthesis and evaluation of inhibitors of Mycobacterium tuberculosis UGM using bioisosteric replacement. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 69, 1 set. 2022.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, jan. 1999

GROSSET, Jacques. **Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: An underestimated adversary.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3 mar. 2003.

GOUDE, R. et al. The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4138–4146, 13 jul. 2009.

GUPTA, Radhey S.; LO, Brian; SON, Jeon. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, 13 fev. 2018.

HOELSCHER, Michael *et al.* **Candidate anti-tuberculosis medicines and regimens under clinical evaluation.** *Clinical Microbiology and Infection* Elsevier B.V., , 1 set. 2024.

HTET, Kyaw Ko Ko; CHONGSUWIVATWONG, Virasakdi; AUNG, Si Thu. Sensitivity and specificity of tuberculosis signs and symptoms screening and adjunct role of social pathology characteristics in predicting bacteriologically confirmed tuberculosis in Myanmar. **Tropical Medicine and Health**, v. 49, n. 1, 1 dez. 2021.

JANKUTE, Monika *et al.* **Assembly of the Mycobacterial Cell Wall.** *Annual Review of Microbiology* Annual Reviews Inc., , 15 out. 2015.

KAPP, E. et al. Antimycobacterial Activity, Synergism, and Mechanism of Action Evaluation of Novel Polycyclic Amines against Mycobacterium tuberculosis. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2021, p. 1–8, 11 jun. 2021.

KNAUF, G. A. et al. Exploring the Antimicrobial Action of Quaternary Amines against *Acinetobacter baumannii*. **mBio**, v. 9, n. 1, 7 mar. 2018.

KNECHEL, Nancy A. Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. **Critical Care Nurse**, v. 29, n. 2, p. 34–43, abr. 2009.

LAIZA DE OLIVEIRA COSTA -MULTIVIX, Izabel. **MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE PULMONAR** Cinthya Dessaune Neves-Multivix 2. [S.l.: S.n.].

LIEBENBERG, Dale; GORDHAN, Bhavna Gowan; KANA, Baves Davandra. **Drug resistant tuberculosis: Implications for transmission, diagnosis, and disease management.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Frontiers Media S.A., , 23 set. 2022.

LIENHARDT, Christian *et al.* **Global tuberculosis control: Lessons learnt and future prospects.** *Nature Reviews Microbiology*, jun. 2012.

LILLY, Eli *et al.* **Cell Viability Assays.** [S.l.: S.n.].

LUIES, Laneke; PREEZ, Ilse du. **The echo of pulmonary tuberculosis: Mechanisms of clinical symptoms and other disease-induced systemic complications.** *Clinical Microbiology Reviews* American Society for Microbiology, , 1 out. 2020a.

LUIES, Laneke; PREEZ, Ilse du. **The echo of pulmonary tuberculosis: Mechanisms of clinical symptoms and other disease-induced systemic complications.** *Clinical Microbiology Reviews* American Society for Microbiology, , 1 out. 2020b.

LUIES, Laneke; PREEZ, Ilse du. **The echo of pulmonary tuberculosis: Mechanisms of clinical symptoms and other disease-induced systemic complications.** *Clinical Microbiology Reviews* American Society for Microbiology, , 1 out. 2020c.

MACGREGOR-FAIRLIE, Michael *et al.* **Tuberculosis diagnostics: Overcoming ancient challenges with modern solutions.** *Emerging Topics in Life Sciences* Portland Press Ltd, , 1 dez. 2020.

MACLEAN, Emily *et al.* **Advances in molecular diagnosis of tuberculosis.** *Journal of Clinical Microbiology* American Society for Microbiology, , 1 out. 2020.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M.-A.; DAFFÉ, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 1, p. 67–85, jan. 2014.

MEXITALIA, Maria *et al.* Effect of tuberculosis treatment on leptin levels, weight gain, and percentage body fat in Indonesian children. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 60, n. 4, p. 118–123, 1 abr. 2017.

MONTALBETTI, Christian A. G. N.; FALQUE, Virginie. **Amide bond formation and peptide coupling.** *Tetrahedron*, 14 nov. 2005.

MORLEY, John E.; THOMAS, David R.; WILSON, Margaret-Mary G. **Cachexia: pathophysiology and clinical relevance 1,2.** [S.l.: S.n.].

NATARAJAN, Arvind *et al.* **A systemic review on tuberculosis.** *Indian Journal of Tuberculosis* Tuberculosis Association of India, , 1 jul. 2020.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **The End TB Strategy**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/the-end-tb-strategy>>.

OMS- Organização Mundial da Saúde. **Global Tuberculosis Report 2023**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>>.

OMS- Organização Mundial da Saúde. **Global Tuberculosis Report 2024**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>>.

OMS- Organização Mundial da Saúde- **Tuberculosis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>>.

OMS- Organização Mundial da Saúde. Updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis. Disponível em: < <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>>

OPAS- Organização Pan-Americana da Saúde. **Casos de tuberculose continuam aumentando nas Américas, mas novas inovações prometem melhorias no diagnóstico precoce e tratamento**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/24-3-2025-casos-tuberculose-continuum-aumentando-nas-americas-mas-novas-inovacoes-prometem>>. Acesso em: 26 jun. 2025.

PAI, Madhukar *et al.* **Tuberculosis**. **Nature Reviews Disease Primers** Nature Publishing Group, , 27 out. 2016.

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.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. **Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections**. [*S.l.: S.n.*]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/38/6/864/320723>>.

PARK, Minwoo *et al.* Distinguishing nontuberculous mycobacterial lung disease and Mycobacterium tuberculosis lung disease on X-ray images using deep transfer learning. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.

PHILIPS, Jennifer A.; ERNST, Joel D. **Tuberculosis pathogenesis and immunity**. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 2012.

RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 13881–13886, 17 nov. 2003.

POLLO, C. F. et al. Prevalence and factors associated with depression and anxiety in patients with psoriasis. **Journal of Clinical Nursing**, v. 30, n. 3-4, p. 572–580, 27 dez. 2020.

REECE, Stephen T.; KAUFMANN, Stefan H. E. **Floating between the poles of pathology and protection: Can we pin down the granuloma in tuberculosis?** *Current Opinion in Microbiology*, fev. 2012.

RAHLWES KATHRYN, C. et al. Pathogenicity and Virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Virulence*, v. 14, n. 1, 23 nov. 2022.

RUSSELL, David G. *et al.* **Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma.** *Nature Immunology*, 2009.

SALA, Stella *et al.* Artigo Original Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo* Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a comparative study. *J Bras Pneumol*, v. 34, n. 12, 2008.

SALAM, Arslan Ahmed *et al.* **IMPORTANCE OF ZIEHL-NEESEN SMEAR AND CULTURE ON LOWENSTEIN JENSEN MEDIUM IN DIAGNOSIS OF PULMONARY TUBERCULOSIS.** 2014.

SANTOS OLIVEIRA, Ana Júlia De Moraes *et al.* Amides Derived from Vanillic Acid: Coupling Reactions, Antimicrobial Evaluation, and Molecular Docking. *BioMed Research International*, v. 2019, 2019.

SATI, Hatim *et al.* The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 2025.

STEENKEN, W.; GARDNER, L. U. History of H37 strain of tubercle bacillus. *American review of tuberculosis*, v. 54, p. 62–6, jul. 1946.

STEENKEN, W. Lysis of Tubercle Bacilli in Vitro. *Experimental Biology and Medicine*, v. 33, n. 2, p. 253–255, 1 nov. 1935.

SCHITO, Marco *et al.* Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, p. S102–S118, 15 out. 2015.

SCHLUGER, Neil W. **The pathogenesis of tuberculosis: The first one hundred (and twenty-three) years.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, abr. 2005.

SINGH, Ramandeep *et al.* PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release. *Science*, v. 322, n. 5906, p. 1392–1395, 28 nov. 2008.

SMITH, Issar. **Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence.** *Clinical Microbiology Reviews*, 1 jul. 2003.

SOARES, Ludmylla Teixeira *et al.* Novos medicamentos para o tratamento da tuberculose pulmonar. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 24, n. 1, p. e14126, 29 jan. 2024.

TORTOLI, E. et al. Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. **European Respiratory Journal**, v. 54, n. 1, p. 1900795, jul. 2019.

TORTOLI, Enrico *et al.* The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 56, p. 19–25, 1 dez. 2017.

TOSTMANN, Alma *et al.* **Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review.** **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)** Blackwell Publishing, , 2008.

VAN SOOLINGEN, Dick *et al.* **Practical biosafety in the tuberculosis laboratory: Containment at the source is what truly counts.** **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease** International Union against Tubercul. and Lung Dis., , 1 ago. 2014.

VINÍCIUS, L.; GURGEL, A. **Química Orgânica Aplicada a Engenharia Geológica Aula 12 Estudo das aminas.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://professor.ufop.br/sites/default/files/legurgel/files/aula_12_qui-147.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2025.

WANG, Li *et al.* Distinguishing nontuberculous mycobacteria from *Mycobacterium tuberculosis* lung disease from CT images using a deep learning framework. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 48, n. 13, p. 4293–4306, 1 dez. 2021.

WILDNER, L. M. Atividade antimicobacteriana in vitro de lactonas sesquiterpênicas e investigação do seu mecanismo de ação. **Universidade Federal de Santa Catarina** 2016.

XU, Yinghua; WANG, Guozhi; XU, Miao. **Biohazard levels and biosafety protection for *Mycobacterium tuberculosis* strains with different virulence.** **Biosafety and Health** Elsevier B.V., , 1 set. 2020.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 7, n. 1, p. 6–21, 1 jan. 2003.

ZHENG, Huajun *et al.* Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, 11 jun. 2008.

ZUMLA, Alimuddin; NAHID, Payam; COLE, Stewart T. **Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens.** **Nature Reviews Drug Discovery**, maio 2013.