

Letícia Muraro Wildner

**Atividade antimicobacteriana *in vitro* de  
lactonas sesquiterpênicas e investigação do seu mecanismo de ação**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Coorientador: Prof. Dr. Simon J. Waddell

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wildner, Letícia Muraro

Atividade antimicobacteriana in vitro de lactonas  
sesquiterpênicas e investigação do seu mecanismo de ação /  
Letícia Muraro Wildner ; orientadora, Maria Luiza Bazzo ;  
coorientador, Simon Waddell. - Florianópolis, SC, 2016.  
254 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Tuberculose. 3. Novos fármacos. 4.  
Lactonas sesquiterpênicas. 5. Mecanismo de ação. I. Bazzo,  
Maria Luiza. II. Waddell, Simon. III. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.  
IV. Título.





*Dedico este trabalho ao  
meu querido vô Darcy.*



## AGRADECIMENTOS

À minha família, que esteve sempre ao meu lado, me incentivando, não só nesta jornada, mas em todo meu caminho. Em especial, à minha mãe, Silvana, e ao meu pai, Leandro. É de casa que vieram meus primeiros exemplos de farmacêutica-bioquímica, professora universitária, pesquisador e de amor à profissão. Vocês me inspiram!

À professora Maria Luiza Bazzo, que muito mais do que orientadora, foi minha mãe científica. Obrigada pelos ensinamentos, pelas oportunidades ao longo desses nove anos e por sempre me incentivar e acreditar em mim.

Ao professor Simon Waddell, pela orientação no doutorado sanduíche e por me receber com o laboratório de portas abertas. Obrigada por todas as oportunidades, por estar sempre presente e por fazer questão de que eu me sentisse parte da sua equipe.

Aos colegas de PGFar Tamires Cardoso Lima, Solomon Amoah e Luiz Antônio Escorteganha Pollo, e à professora Maique Weber Biavatti, por conceder os extratos e compostos estudados neste trabalho.

À Carolina Eto, pela ajuda nos ensaios em modelo de granuloma-*like* e ao professor André Báfica, por abrir as portas do laboratório.

À professora Thaís Marques Sincero, pela orientação durante o estágio em docência.

Ao Setor de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC, por autorizar a utilização do espaço para manipulação de micobactérias.

A todos os colegas e amigos que passaram pelo LBMM e pelo LOEH durante este período, pela amizade e ajuda, dentro e fora do laboratório. Com certeza os dias de trabalho são melhores em um ambiente tomado pela amizade. Em especial, agradeço à Lorena, pela ajuda brilhante com a parte química, desde a época do desespero da qualificação, ao Eduardo e à Marick, por estarem sempre dispostos a ajudar, e à Clarice, pela ajuda com a qPCR que me deixou sem palavras.

À Ana Carolina Rabelo de Moraes, pela amizade ao longo de todos esses anos no laboratório, pelas conversas científicas e pelas muitas não científicas também.

Ao Daire, meu maior companheiro de laboratório. Obrigada pela paciência em me treinar, por toda a ajuda no laboratório e por ser, sem dúvidas, a pessoa mais importante na minha adaptação ao Reino Unido.

A todos os amigos de Brighton, muito importantes numa época em que minha vida pessoal e profissional estiveram muito ligadas. Obrigada pela amizade, por fazer eu me sentir em casa e pelas minhas melhores lembranças da terra da rainha.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas de doutorado e de doutorado sanduíche.

À Brighton and Sussex Medical School (BSMS), pelo auxílio financeiro que permitiu a execução dos experimentos no doutorado sanduíche.

Ao PGFar/UFSC, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Sinto muita gratidão ao olhar pra trás e perceber como tantas pessoas foram importantes durante meu caminho até aqui. A todos, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

**Introdução:** A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa considerada um problema global de saúde pública. A terapia em longo prazo, somada aos efeitos adversos dos medicamentos, contribui para a não adesão do paciente, o que resulta em falência do tratamento e seleção de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes. Por isso, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, que permitam a redução do tempo de tratamento e sejam uma alternativa para o tratamento de cepas resistentes, são considerados urgentes. Produtos naturais representam importantes fontes para o desenvolvimento de novos fármacos. A atividade antimicobacteriana já foi relatada para diversos compostos pertencentes a diferentes classes químicas, isolados de plantas, fungos e organismos marinhos, o que estimula a pesquisa de novos fármacos para o tratamento da TB provenientes de fontes naturais. **Objetivos:** Avaliar atividade antimicobacteriana *in vitro* de extratos e compostos naturais isolados de *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida* e investigar seu mecanismo de ação. **Métodos:** Inicialmente, foi realizada uma triagem de 10 extratos e 11 compostos isolados obtidos das plantas *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida* quanto à atividade antimicobacteriana *in vitro* frente a cepas referência de *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium fortuitum*, em concentrações entre 1,56 µg/mL e 100 µg/mL. Sete lactonas sesquiterpênicas (LS) apresentaram os melhores resultados e foram escolhidas para seguimento dos estudos da atividade antimicobacteriana *in vitro*, além da realização de análises *in silico* e estudo do seu mecanismo de ação, por meio da avaliação do perfil transcricional de *M. tuberculosis* após o tratamento com os compostos. **Resultados:** As LS (LS01 a LS07) apresentaram atividade antimicobacteriana frente a *M. tuberculosis* em fase exponencial de crescimento, de modo tempo e dose dependentes, com concentração inibitória mínima (MIC) variando de 6,25 µg/mL a 25 µg/mL. LS06 e LS07 também apresentaram atividade frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo, em concentrações correspondentes a 4xMIC e 8xMIC, respectivamente. Nenhum dos compostos apresentou atividade frente a *M. avium* e *M. fortuitum*. Quando testados frente a isolados clínicos resistentes aos fármacos, os compostos apresentaram MIC semelhante às obtidas com os isolados sensíveis. Quando em combinação com isoniazida (INH) e rifampicina (RMP), os compostos não apresentaram sinergismo nem antagonismo.

Os índices de seletividade variaram entre 1,77 a 11,88 em células de linhagem pulmonar MRC5. LS01, L06 e LS07 também apresentaram atividade frente a bacilos intracelulares, em modelo de infecção de macrófagos e demonstraram capacidade de proteção às células infectadas em concentrações correspondentes à MIC. Já quando em concentrações superiores, apresentaram citotoxicidade. Quando testada em estrutura granuloma-like, LS01 foi capaz de reduzir a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) na concentração 100 µM. As predições *in silico* indicaram que as LS estudadas neste trabalho podem apresentar boa biodisponibilidade por via oral, entretanto, podem sofrer intenso metabolismo de primeira passagem e apresentar altas taxas de ligação a proteínas plasmáticas. A análise do perfil transcricional de *M. tuberculosis* após o tratamento com LS01, LS06 e LS07 sugere que sua resposta pode estar relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que foi confirmado posteriormente, pela detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em culturas de *M. tuberculosis* tratadas com os compostos. Este perfil também pode estar associado à habilidade das LS de se ligar aos resíduos de cisteína presentes em proteínas e no micotiol. **Conclusão:** Os compostos LS01-LS07 apresentaram boa atividade antimicobacteriana *in vitro* e parecem ter um novo mecanismo de ação quando comparadas aos fármacos utilizados atualmente no tratamento da TB e àqueles que se encontram em estudo clínico.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose, novos fármacos, atividade antimicobacteriana, lactonas sesquiterpênicas, mecanismo de ação.

## ABSTRACT

**Background:** Tuberculosis (TB) is a serious public health problem worldwide with one-third of the world's population estimated to be infected with *Mycobacterium tuberculosis*. TB treatment requires the use of multiple drugs for at least 6 months. This lengthy drug therapy and adverse reactions to the drugs contribute to patient non-compliance, resulting in treatment failure and emergence of *M. tuberculosis* drug-resistant strains. There is an urgent need for new drugs to treat TB and natural products represent an important source for drug discovery. Several chemical classes of compounds isolated from plants, fungi and marine organisms have been described as potential antitubercular drugs, stimulating the search for new antimycobacterial agents isolated from natural sources. **Aims:** To evaluate the *in vitro* antimycobacterial activity of plant extracts and isolated plant-derived compounds from *Calea uniflora* and *Calea pinnatifida* and investigate their mode of action. **Methods:** A primary screening was conducted with 10 extracts from *C. uniflora* and *C. pinnatifida* and 12 purified compounds against *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium fortuitum* at concentrations ranging from 1.56 to 100 µg/mL. Seven sesquiterpene lactones (LS) showed the best results and were chosen for following studies on the *in vitro* antimycobacterial activity and also for *in silico* tests and transcriptional profiling analysis, in order to investigate their mode of action. **Results:** The LS (LS01-LS07) showed antimicrobial activity against *log* phase *M. tuberculosis* in a time- and concentration-dependent manner, with minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 6.25 to 25 µg/mL. LS06 and LS07 were also active against non-replicating *M. tuberculosis* at 4xMIC and 8xMIC, respectively. None of the compounds were active against *M. avium* and *M. fortuitum*. When tested against MDR *M. tuberculosis* clinical isolates, the compounds showed similar MIC compared to the sensitive isolates. They did not show synergism nor antagonism in combination with isoniazid or rifampicin. The selectivity index ranged from 1.77 to 11.88 in MRC5 lung cell line. LS01, LS06 and LS07 were also active against intracellular *M. tuberculosis* and were able to protect the infected cells at their MIC. Higher concentrations were found to be cytotoxic. When tested in a granuloma-like structure, LS01 reduced de colony forming units (CFU) counting at 100 µM. *In silico* studies indicate that these compounds may have good oral bioavailability, but intense first pass

metabolism and high rates of plasma proteins binding. The transcriptional profiling analysis showed the response to LS01, LS06 and LS07 may be related to reactive oxygen species (ROS) generation, which was confirmed by the detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *M. tuberculosis* cultures treated with the compounds. This response also may be related to the ability of the LS to bind to cysteine residues present in proteins and mycothiol. **Conclusion:** The LS 01-07 showed good *in vitro* antimycobacterial activity and seem to have a novel mode of action compared to the drugs currently used for the TB treatment and compared to the TB pipeline, which made them promising molecules for further studies.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, drug discovery, antimycobacterial activity, sesquiterpene lactones, mode of action.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Linha do tempo da descoberta dos fármacos utilizados no atual tratamento de primeira e segunda linhas da tuberculose.....	44
<b>Figura 2.</b> Fármacos em estudo de fases clínica e pré-clínica para o tratamento da tuberculose.....	46
<b>Figura 3.</b> Carboesqueleto dos principais grupos de lactonas sesquiterpênicas.....	50
<b>Figura 4.</b> Fluxograma da avaliação dos compostos quanto à atividade antimicobacteriana <i>in vitro</i> .....	58
<b>Figura 5.</b> Esquema de obtenção das frações dos extratos e dos compostos isolados de (a) <i>Calea uniflora</i> e (b) <i>Calea pinnatifida</i> .....	59
<b>Figura 6.</b> Estrutura química dos compostos isolados de <i>Calea uniflora</i> .....	61
<b>Figura 7.</b> Estrutura química dos compostos isolados de <i>Calea pinnatifida</i> .....	61
<b>Figura 8.</b> Estrutura química dos compostos LS06 e LS07.....	62
<b>Figura 9.</b> Esquema de combinações entre LS01 e isoniazida.....	69
<b>Figura 10.</b> Avaliação da atividade bactericida dos extratos e frações de <i>Calea uniflora</i> e <i>Calea pinnatifida</i> .....	92
<b>Figura 11.</b> Determinação da viabilidade celular bacteriana após tratamento com os compostos LS01, LS05, LS06 e LS07.....	94
<b>Figura 12.</b> Atividade bactericida dos compostos LS01-LS07.....	95
<b>Figura 13.</b> Curva de tempo de morte de LS01.....	97
<b>Figura 14.</b> Curva de tempo de morte de LS05.....	97
<b>Figura 15.</b> Curva de tempo de morte de LS06.....	98
<b>Figura 16.</b> Curva de tempo de morte de LS07.....	98
<b>Figura 17.</b> Curva de tempo de morte de isoniazida.....	99
<b>Figura 18.</b> Atividade dos compostos LS01, LS02, LS06 e LS07 frente a <i>M. tuberculosis</i> em estado não-replicativo.....	103
<b>Figura 19.</b> Atividade isoniazida e rifampicina frente a <i>M. tuberculosis</i> em estado não-replicativo.....	104
<b>Figura 20.</b> Atividade antimicobacteriana dos compostos LS01, LS06 e LS07 em macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i> .....	105
<b>Figura 21.</b> Atividade antimicobacteriana de isoniazida em macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i> .....	107
<b>Figura 22.</b> Viabilidade de macrófagos derivados de células THP-1 infectados com <i>M. tuberculosis</i> , após tratamento com LS01 e	

LS06.....	108
<b>Figura 23.</b> Atividade antimicobacteriana do composto LS01 em estrutura granuloma-like.....	110
<b>Figura 24.</b> Alinhamento de LS01 e LS06.....	116
<b>Figura 25.</b> Alinhamento de LS01, LS02 e LS03.....	116
<b>Figura 26.</b> Alinhamento de LS01, LS06 e LS07 aos pares.....	117
<b>Figura 27.</b> Alinhamento de LS01, LS06 e LS07.....	118
<b>Figura 28.</b> Efeito dos compostos LS01, LS06 e LS07 na viabilidade de <i>M. tuberculosis</i> em cultura líquida, após tratamento por 24 horas, em concentrações correspondentes a 10xMIC.....	119
<b>Figura 29.</b> Rendimento da extração de RNA a partir diferentes volumes de cultura líquida de <i>M. tuberculosis</i> .....	120
<b>Figura 30.</b> Gráficos representativos do teste <i>Principal Component Analysis</i> .....	122
<b>Figura 31.</b> Expressão relativa de <i>M. tuberculosis</i> tratado com LS01, LS06, LS07 ou POD, após normalização dos dados.....	123
<b>Figura 32.</b> Gráfico representativo da expressão relativa das triplicatas biológicas de <i>M. tuberculosis</i> após tratamento com LS01, LS06, LS07 e POD.....	124
<b>Figura 33.</b> Gráfico representativo das alterações na expressão dos principais genes após tratamento com os compostos LS01, LS06, LS07 e POD.....	125
<b>Figura 34.</b> Número total de genes com expressão diferenciada após tratamento de <i>M. tuberculosis</i> com LS01, LS07, LS07 ou POD.....	126
<b>Figura 35.</b> Genes super e supraexpressos após tratamento de <i>M. tuberculosis</i> com LS01, LS06 e LS07, divididos por categorias funcionais.....	128
<b>Figura 36.</b> Curvas de dissociação dos genes 16S rRNA (a) e <i>arsC</i> (b).....	129
<b>Figura 37.</b> Produtos de amplificação visualizados após eletroforese em gel de agarose.....	130
<b>Figura 38.</b> Gráfico representativo da variação da estabilidade dos genes de referência 16S rRN e <i>polA</i> .....	131
<b>Figura 39.</b> Expressão relativa dos genes selecionados para validação do <i>microarray</i> , após tratamento de <i>M. tuberculosis</i> com LS01 (a), LS06 (b), LS07 (c) e POD (d).....	133
<b>Figura 40.</b> Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio por LS06 e LS07.....	135

**Figura 41.** Esqueletos carbônicos numerados das LS do tipo germacranolídeos (a) e lindenanolídeos (b)..... 139



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação de compostos isolados de <i>Calea uniflora</i> e <i>Calea pinnatifida</i> testados quanto à atividade antimicobacteriana <i>in vitro</i> .....	60
<b>Tabela 2.</b> Quantidade de cada composto isolado disponível para execução dos ensaios.....	62
<b>Tabela 3.</b> Sequência dos iniciadores utilizados na qPCR para validação dos <i>microarrays</i> .....	85
<b>Tabela 4.</b> MIC, IC <sub>50</sub> e índice de seletividade para os compostos isolados de <i>Calea uniflora</i> e <i>Calea pinnatifida</i> .....	93
<b>Tabela 5.</b> MIC dos compostos LS01, LS02, LS03, LS06 e LS07 frente a isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> sensíveis aos fármacos utilizados no tratamento de primeira linha da tuberculose.....	100
<b>Tabela 6.</b> MIC dos compostos LS01, LS02, LS03, LS06 e LS07 frente a isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> monorresistentes à isoniazida.....	101
<b>Tabela 7.</b> MIC dos compostos LS01, LS02, LS03, LS06 e LS07 frente a isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a múltiplos fármacos.....	101
<b>Tabela 8.</b> Medianas dos MIC dos compostos LS01, LS02, LS04, LS06 e LS07 frente a isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> sensíveis, resistentes à isoniazida e resistentes a múltiplos fármacos.....	102
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros físico-químicas estruturais dos compostos isolados que apresentaram atividade antimicobacteriana.....	111
<b>Tabela 10.</b> Predição das propriedades farmacocinéticas dos compostos LS01-LS07.....	113
<b>Tabela 11.</b> Índice de bioatividade para as lactonas sesquiterpênicas.....	114
<b>Tabela 12.</b> Características espaciais e de ligação de LS01-LS07...	115
<b>Tabela 13.</b> Temperaturas de dissociação (T <sub>M</sub> ) dos produtos de amplificação da qPCR.....	129
<b>Tabela 14.</b> Eficiência dos iniciadores utilizados na qPCR.....	132
<b>Tabela 15.</b> Comparação dos dados de expressão relativa obtido no <i>microarray</i> e na qPCR.....	134



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTs	do inglês, <i>Artemisinin-based Combination Therapies</i> - terapias combinadas à base de artemisinina
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AH	Aceptores de ligação hidrogênio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
aRNA	RNA amplificado
ART	Artemisinina
ASP	Área de superfície polar
ATS	do inglês, <i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BO	Biodisponibilidade via oral
cDNA	DNA complementar
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Cq	Ciclo de quantificação
DH	Doadores de ligação hidrogênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica

DOTS	do inglês, <i>Directly Observed Treatment Short - Estratégia do Tratamento Direto Observado da Tuberculose</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
dsDNase	do inglês, <i>double strand DNase</i> – DNase para DNA dupla fita
ECP	Extrato bruto de <i>Calea pinnatifida</i>
ECU	Extrato bruto de <i>Calea uniflora</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FACP	Fração acetato de <i>Calea pinnatifida</i>
FACU	Fração acetato de <i>Calea uniflora</i>
FDCP	Fração diclorometano de <i>Calea pinnatifida</i>
FDCU	Fração diclorometano de <i>Calea uniflora</i>
FHCP	Fração hexano de <i>Calea pinnatifida</i>
FHCU	Fração hexano de <i>Calea uniflora</i>
FICI	do inglês, <i>fractional inhibitory concentration index</i> - Índice da concentração inibitória fracionária
FXCP	Fração residual aquosa de <i>Calea pinnatifida</i>
FXCU	Fração residual aquosa de <i>Calea uniflora</i>
GTC	do inglês, <i>guanidine thiocyanate</i> - Tiocianato de guanidina

HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HFB	Regiões hidrofóbicas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC <sub>50</sub>	do inglês, <i>inibitory concentration 50%</i> – Concentração inibitória 50%
IDSA	do inglês, <i>Infectious Diseases Society of America</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-2	Interleucina-2
INH	Isoniazida
LD	do inglês, <i>lethal dose</i> – Dose letal
LS	Lactonas sesquiterpênicas
MBC	do inglês, <i>minimum bactericidal concentration</i> – Concentração bactericida mínima
MCR	Micobactérias de crescimento rápido
MDR	do inglês, <i>multidrug resistant</i> – Resistente a múltiplos fármacos
MIC	do inglês, <i>minimum inhibitory concentration</i> – Concentração inibitória mínima
MNT	Micobactérias não-tuberculosas
MOI	do inglês, <i>multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
MPP	Metabolismo de primeira passagem
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

MTT	do inglês, <i>methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i> brometo de dimeriazol difeniltetrazólio
OADC	do inglês, <i>oleic acid, albumin, dextrose, catalase</i> - Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica em 600 nm
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salino
PCA	do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE/PPE	Prolina-ácido glutâmico/ prolina-prolina-ácido glutâmico
PMA	do inglês, <i>phorbol 12-myristate-13-acetate</i> – Acetato miristato de forbol
POD	Podoandina
PPP	Porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas
qPCR	PCR quantitativa
REDCA	do inglês, <i>resazurin drugs combination microtiter assay</i>
REMA	do inglês, <i>resazurin microtiter assay plate</i>
RLU	do inglês, <i>relative light unit</i> – Unidades relativas de luz)
RMP	Rifampicina

RNA	do inglês, <i>ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
SDS	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i> – dodecil sulfato de sódio
SELTZ	Esquema para tratamento de tuberculose multirresistente, composto por estreptomicina, etambutol, levofloxacina, rifampicina e terizidona
SI	do inglês, <i>selectivity index</i> – Índice de seletividade
SNC	Sistema nervoso central
sRNA	do inglês, <i>small RNA</i>
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multirresistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
TDO	Tratamento diretamente observado
T <sub>M</sub>	Temperatura de dissociação
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
tRNA	RNA transportador
UFC	Unidades formadoras de colônias
USA	do inglês, <i>United States of America</i> – Estados Unidos da América



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	29
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	31
2.1 MICOBACTÉRIAS.....	31
2.1.1 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	32
2.1.2 Micobactérias não-tuberculosas.....	33
2.2 TUBERCULOSE.....	33
2.2.1 Manifestações clínicas.....	36
2.2.2 Tratamento.....	37
2.2.3 Epidemiologia.....	38
2.3 MICOBACTERIOSES.....	40
2.4 NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	43
2.5 PRODUTOS NATURAIS E O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	46
2.6 GÊNERO <i>CALEA</i> .....	48
2.7 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS .....	49
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	53
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	55
4.1 OBJETIVO GERAL.....	55
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	57
5.1 EXTRATOS E COMPOSTOS.....	57
5.2 CULTIVO DAS CEPAS DE MICOBACTÉRIAS.....	63
5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA <i>IN VITRO</i> .....	63
5.3.1 Triagem dos extratos e compostos.....	63
5.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima.....	64
5.3.3 Determinação da concentração bactericida mínima.....	64
5.3.4 Ensaio de citotoxicidade.....	65
5.3.5 Cálculo do índice de seletividade.....	66
5.3.6 Ensaio da curva de tempo de morte.....	66
5.3.7 Avaliação dos compostos frente a isolados clínicos.....	67
5.3.8 Ensaio de combinações antimicrobianas.....	68
5.3.9 Avaliação da atividade bactericida frente a <i>M. tuberculosis</i> em estado não-replicativo.....	70
5.3.10 Avaliação a atividade antimicobacteriana em macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i> .....	71

<b>5.3.11 Avaliação da atividade antimicrobacteriana em estrutura <i>granuloma-like</i></b> .....	73
<b>5.4 ESTUDOS <i>IN SILICO</i></b> .....	74
<b>5.4.1 Perfil físico-químico dos compostos isolados</b> .....	74
<b>5.4.2 Perfil farmacocinético</b> .....	74
<b>5.4.3 Alinhamento das moléculas</b> .....	75
<b>5.4.4 Cálculo do índice de bioatividade</b> .....	75
<b>5.5 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO</b> .....	76
<b>5.5.1 Microarrays</b> .....	76
5.5.1.1 Determinação da concentração dos compostos e tempo de tratamento.....	76
5.5.1.2 Determinação do volume mínimo de amostra para extração de RNA.....	78
5.5.1.3 Extração do RNA.....	80
5.5.1.4 Amplificação do RNA.....	80
5.5.1.5 Marcação fluorescente do aRNA.....	81
5.5.1.6 Fragmentação do aRNA.....	82
5.5.1.7 Hibridização.....	82
5.5.1.8 Análise estatística.....	83
<b>5.5.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa</b> .....	83
<b>5.5.3 Ensaio para detecção de espécies reativas de oxigênio</b> .....	86
<b>5.5.4 Seleção de mutantes espontâneos</b> .....	87
5.5.4.1 Extração do DNA.....	88
5.5.4.2 Sequenciamento completo do genoma.....	89
<b>6 RESULTADOS</b> .....	91
6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBACTERIANA <i>IN VITRO</i> .....	91
6.2 ESTUDOS <i>IN SILICO</i> .....	110
6.3 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO.....	118
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	137
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	161
<b>9 PERSPECTIVAS</b> .....	165
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	167
<b>APÊNDICE A – Listas dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS01</b> .....	195
<b>APÊNDICE B – Listas dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS06</b> .....	201
<b>APÊNDICE C – Listas dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS07</b> .....	215
<b>APÊNDICE D – Listas dos genes diferencialmente expressos após tratamento com podoandina</b> .....	241

<b>APÊNDICE E – Listas dos genes em comum, diferencialmente expressos após tratamento com LS01, LS06 e LS07.....</b>	<b>243</b>
<b>APÊNDICE F – Listas dos genes em comum, diferencialmente expressos após tratamento com LS06 e LS07.....</b>	<b>247</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa considerada um problema global de saúde pública, que acomete principalmente os pulmões, podendo atingir outros sítios anatômicos ou ocorrer de maneira disseminada. Sua transmissão se dá pela inalação de aerossóis produzidos pela pessoa infectada e portadora de TB pulmonar ativa, por meio de tosse, espirro ou fala. Aproximadamente a terça parte da população mundial abriga o bacilo da TB e, para o ano de 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de 9,6 milhões de novos casos e cerca de 1,5 milhões de óbitos devido à doença (WHO, 2015a).

O tratamento da TB é desafiador, pois requer diagnóstico rápido e acurado da doença, pesquisa de resistência aos fármacos, administração dos fármacos por pelo menos seis meses e acompanhamento do tratamento, por meio da estratégia de tratamento diretamente observado (TDO). A terapia a longo prazo, somada aos efeitos adversos dos medicamentos, contribui para a não adesão do paciente, o que resulta em falência do tratamento e seleção de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos. Por isso, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, que permitam a redução do tempo de tratamento e sejam uma alternativa para o tratamento de cepas resistentes, são considerados urgentes (ZUMLA, NAHID & COLE, 2013).

Produtos naturais representam importantes fontes para o desenvolvimento de novos fármacos, o que é especialmente evidente em áreas como oncologia e doenças infecciosas. De acordo com Newman e Cragg (2016), somente 3 das 20 classes de antimicrobianos em uso clínico são provenientes de fontes sintéticas, enquanto cerca de 70% dos antimicrobianos são de origem natural ou tiveram seu desenvolvimento baseado na estrutura de compostos naturais. Diversos compostos de diferentes classes químicas, isolados de plantas, fungos e organismos marinhos já foram testados frente às micobactérias, e os achados de atividades significativas *in vitro*, principalmente em derivados de plantas, estimulam o desenvolvimento de pesquisas em busca de novos agentes antimicobacterianos isolados de fontes naturais (GUZMÁN et al., 2012; SALOMON & SCHMIDT, 2012).



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MICOBACTÉRIAS

As micobactérias são microrganismos que apresentam forma bacilar, com dimensões que variam de 0,2 $\mu$ m a 0,6 $\mu$ m de largura e 1 $\mu$ m a 10 $\mu$ m de comprimento. São bacilos delgados, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e incapazes de formar esporos, conídeos ou cápsulas. O tempo de multiplicação é, geralmente, lento (em média de 18 a 20 horas) e apresenta grande variação dentro do gênero, o que permite dividi-las em micobactérias de crescimento rápido (MCR - crescimento visível em menos de sete dias) e em micobactérias de crescimento lento (crescimento visível em mais de sete dias) (LEÃO et al., 2004; BARRERA, 2007).

As micobactérias não são coradas pelo método de Gram. Para a sua coloração são usados, geralmente, os métodos de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun. Ambas as técnicas utilizam carbolfucsina, que confere coloração vermelha às micobactérias. Por resistirem ao descoloramento subsequente com solução álcool-ácido, receberam a designação de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR). Esta característica tintorial deve-se ao alto teor de lipídeos – cerca de 60% do seu peso seco – que integra a sua parede celular, composta basicamente por uma membrana citoplasmática recoberta por espessa camada de peptidoglicano (ácido N-glicolilmurâmico), o qual se encontra covalentemente ligado às cadeias de arabinogalactano que, por sua vez, estão esterificadas na sua extremidade com ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos micólicos. Essa parede celular única, espessa e hidrofóbica, confere às micobactérias resistência à descoloração por álcool-ácido, assim como é um dos principais responsáveis pela resistência à ação de diversos agentes químicos e antimicrobianos e pela capacidade de formar aerossóis e biofilmes (BARRERA, 2007; COOK et al., 2009; FALKINHAM, 2009).

Em 1896, Lehmann e Neumann propuseram a criação do gênero *Mycobacterium*, visando a inclusão dos bacilos da tuberculose e da hanseníase, até então classificados como *Bacterium tuberculosis* e *Bacterium leprae*. Este gênero faz parte da família Mycobacteriaceae e está posicionado taxonomicamente na subordem Corynebacterineae, que pertence à ordem Actinomycetales, da subclasse Actinobacteridae, da classe e do filo Actinobacteria, do domínio Bacteria. Esta taxonomia

baseia-se em três critérios: resistência à descoloração por álcool-ácido, síntese de ácidos micólicos e porcentagem de citosina e guanina (C+G) do DNA genômico compreendida entre 61mol% e 71mol% (LEÃO et al., 2004; BARRERA, 2007; EUZÉBY, 2016).

O gênero *Mycobacterium* tem sofrido atualizações constantes. A ele pertencem, atualmente, 175 espécies e 13 subespécies (EUZÉBY, 2016). É constituído pelo *M. leprae*, por espécies que compõem o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e outras micobactérias denominadas Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) (BROSCH et al., 2002; McGRATH et al., 2010).

Conforme sua patogenicidade em seres humanos, as micobactérias foram classificadas, por Kazda, em três grupos: estritamente patogênicas, potencialmente patogênicas e raramente patogênicas ou saprófitas. As espécies estritamente patogênicas incluem as do CMTB e *M. leprae*, e as classificadas como potencialmente patogênicas e raramente patogênicas compreendem as MNT (BRASIL, 2008).

### **2.1.1 Complexo *Mycobacterium tuberculosis***

O CMTB é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose (TB) humana; *M. bovis*, principal agente da TB bovina e também agente da TB humana; *M. bovis*-BCG (*Bacille Calmette-Guérin*), cepa atenuada utilizada na vacinação antituberculosa; *M. africanum*, agente da TB humana encontrado mais frequentemente no continente Africano; *M. caprae*, causador de TB em caprinos e humanos; *M. microti*, que causa TB em roedores e em humanos; *M. pinnipedii*, agente da TB em leões marinhos e humanos; *M. canettii*, variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália; e *M. mungi*, espécie descrita recentemente como causadora de TB em mangustos listrados (*Mungos mungo*) em Botsuana. As espécies deste complexo são consideradas estritamente patogênicas; não conseguem sobreviver no meio ambiente por longo período e, por isso, causam infecção no homem e/ou animais (BROSCH et al., 2002; BARRERA, 2007; ALEXANDER et al., 2010).

O CMTB é caracterizado por apresentar 99,9% de similaridade genética entre as espécies e compartilhar a mesma sequência da região 16S rRNA. No entanto, as espécies apresentam diferenças quanto aos reservatórios naturais, à patogenicidade e às características fenotípicas e

epidemiológicas (NIEMANN; RICHTER; RÜSCH-GERDES, 2000; BROSCHE et al., 2002; MOSTOWY; BEHR, 2005).

### 2.1.2 Micobactérias não-tuberculosas

As MNT estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser isoladas de diversos sítios do corpo humano, tanto como saprófitas quanto como causadoras de infecções oportunistas. São capazes de se multiplicar mesmo em condições de escassez nutricional, altas temperaturas e extremos de pH. Além disso, devido à hidrofobicidade de sua parede celular, são resistentes ao glutaraldeído e aos processos de cloração utilizados para o tratamento de água e, ainda, possuem a capacidade de formar biofilme como um mecanismo de sobrevivência (KATOCH, 2004; FALKINHAM, 2009).

Estas bactérias não são patógenos obrigatórios e sua transmissão interpessoal nunca foi demonstrada, por isso, as micobacterioses não são consideradas doenças contagiosas. Devido ao amplo espectro de virulência deste grupo, as espécies associadas com doença podem ser consideradas desde patógenos primários, como por exemplo, *M. kansasii*, capaz de causar infecções em indivíduos saudáveis; causadores de doença em indivíduos com fatores predisponentes, como *M. avium*; até espécies raramente associadas com doença, como por exemplo, *M. goodii*. Apesar de descritas mais de 150 espécies de MNT, nem todas foram associadas como causadoras de infecções em humanos (AREND; van SOOLINGEN; OTTENHOFF, 2009; FALKINHAM, 2009).

## 2.2 TUBERCULOSE

A TB é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica, causada pelas espécies de micobactérias que compõem o CMTB. Acomete principalmente os pulmões (TB pulmonar), podendo também atingir outros sítios anatômicos (TB extrapulmonar) ou ocorrer de maneira disseminada (TB miliar) (WHO, 2015a).

A transmissão se dá por via aérea, pela inalação de aerossóis produzidos pela pessoa infectada e portadora da TB pulmonar ativa, por meio de tosse, espirro ou fala. Os bacilos presentes nestas secreções são

atomizados em partículas (gotículas de *Flügge*) que, após sofrerem evaporação, permanecem em suspensão no ar, na forma de um núcleo infeccioso (núcleo de *Wells*), de 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, composto de 1 ou 2 bacilos. Após a inalação, os bacilos são levados até a árvore brônquica e atingem os alvéolos, onde iniciarão o processo patológico, caso consigam ultrapassar os mecanismos de defesa inespecíficos e multiplicar-se dentro do macrófago alveolar. Se isso ocorrer, será gerada uma reação inflamatória local que levará à formação de um foco pulmonar. A partir deste foco ocorrerá a disseminação linfática até o gânglio satélite (foco ganglionar). Poderá também ocorrer disseminação hematogênica, resultando em formas extrapulmonares e TB disseminada (CAMPOS, 2006; PHILIPS; ERNST, 2012).

Ao atingir os alvéolos pulmonares, os bacilos são reconhecidos pelos macrófagos e células dendríticas residentes no local. O reconhecimento de *M. tuberculosis* levará à ativação dos macrófagos, resultando em fagocitose dos bacilos e ativação de mecanismos bactericidas. Enquanto isso, macrófagos também migram para os linfonodos, onde apresentam epítomos bacterianos às células CD4+ e CD8+, ativando-as e iniciando o processo de proliferação clonal. Os linfócitos T ativados migram para o local da infecção e, juntamente com os macrófagos, intensificam o processo inflamatório local, secretando citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Estas citocinas atraem mais células inflamatórias, que se organizam na forma de granuloma, característica histopatológica clássica da TB. O granuloma contém um núcleo necrótico, formado por tecido pulmonar e macrófagos contendo *M. tuberculosis* fagocitados, cercado por fibroblastos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos B e T. Esta estrutura é caracterizada por baixos níveis de oxigênio, pH e nutrientes, restringindo o crescimento do bacilo da TB e levando a micobactéria a um estado de dormência. Por sua vez, os bacilos são capazes de persistir dentro dos macrófagos, graças a mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, como por exemplo, inibição da maturação do fagossomo e eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas pelos macrófagos. Então, o granuloma é o local em que os bacilos são capazes de crescer e persistir, mas também o microambiente imunológico no qual células com atividades antimicobacterianas são capazes de interagir, a fim de controlar e prevenir a disseminação da doença. O granuloma pode persistir por anos contendo o patógeno de forma eficiente, o que é resultante de um equilíbrio entre o hospedeiro e a micobactéria. A instalação de uma lesão progressiva está diretamente ligada ao grau da lesão

pulmonar que, por sua vez, é proporcional à quantidade do inóculo do bacilo e à virulência da cepa e inversamente proporcional à imunidade inata e adquirida do hospedeiro. Aproximadamente 5% dos indivíduos infectados por *M. tuberculosis* desenvolverão a doença num período de dois a cinco anos (TB primária). Já cerca de 90% dos infectados controlam a infecção com sucesso, de forma assintomática, caracterizando a TB latente. Em cerca de 5% destes indivíduos, ocorrerá a reativação da infecção, devido a alterações no sistema imune decorrentes, por exemplo, de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), subnutrição ou uso de imunossuppressores. Nestes casos, o granuloma já não é mais capaz de conter os bacilos e as micobactérias voltam a se replicar. Com a progressão da multiplicação bacteriana, a estrutura do granuloma é perdida, podendo levar à liquefação do tecido e à formação de cavitações. Incapazes de sobreviver nestas lesões e de conter as micobactérias, os macrófagos são destruídos e as bactérias passam para o meio extracelular, podendo ser liberadas pelas vias aéreas e infectar outros indivíduos (FLYNN; CHAN; LIN, 2011; PHILIPS; ERNST, 2011; GUPTA et al., 2012).

O pulmão é o primeiro órgão a ser atingido pelos bacilos, além de possibilitar condições ideais para o seu crescimento; assim, em 90% das vezes a doença aí se localiza. A transmissão é plena enquanto o paciente estiver eliminando bacilos e não tiver iniciado o tratamento. Com o esquema terapêutico recomendado, a transmissão é reduzida, gradativamente, a níveis insignificantes, ao fim de poucos dias ou semanas. A transmissibilidade inter-humana ocorre apenas na forma pulmonar e na forma laríngea, portanto, as formas extrapulmonares não são transmissíveis por via aerógena (ROSEMBERG; TARANTINO, 2002; CAMPOS, 2006).

A pandemia pelo HIV favoreceu o aumento de novos casos de TB. Uma complexa interação entre *M. tuberculosis* e HIV ocorre em pacientes coinfectados, o que resulta em um sinergismo que leva ao agravamento de ambas as infecções: o HIV promove a progressão da TB latente para TB doença, enquanto *M. tuberculosis* favorece o aumento da replicação do HIV e acelera a evolução natural do HIV (PALMERO, 2007; KWAN; ERNST, 2011). Estudos demonstraram que indivíduos que vivem com HIV coinfectados com TB apresentam 21-34 vezes mais chances de desenvolver TB doença em relação a pacientes HIV-soronegativos. Assim, a infecção pelo HIV é considerada o maior fator de risco para TB, e suas altas taxas de prevalência são significativamente correlacionadas com altas taxas de incidência de TB (KWAN & ERNST, 2011). Isto causa impacto no controle da TB e

também no aumento da frequência das formas graves, extrapulmonares e disseminadas na manifestação da aids (LOPES et al., 2006; RAGHAVAN; ALAGARASU; SELVARAJ, 2011).

Além do HIV, outras condições médicas são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de TB e falência no tratamento, tais como diabetes *mellitus*, doenças renais graves, silicose, neoplasias, transplantes de órgãos, tabagismo, alcoolismo, desnutrição e tratamentos com imunossupressores. Ainda, a TB é um dos agravos fortemente influenciados por determinantes sociais. Com isso, além dos fatores relacionados ao sistema imunológico, o adoecimento por TB também está altamente ligado à pobreza e à exclusão social. Assim, alguns grupos populacionais possuem maior vulnerabilidade devido às condições de saúde e de vida a que estão expostos (WHO, 2015a).

### **2.2.1 Manifestações clínicas**

Alguns pacientes com TB pulmonar não demonstram nenhum indício da doença e outros apresentam sintomas aparentemente simples, que são ignorados durante alguns meses ou anos. Na maioria dos casos, os sinais e sintomas mais frequentes são tosse seca e contínua no início, seguida por presença de secreção por mais de três semanas; astenia; febre baixa, geralmente vespertina; sudorese noturna; inapetência; palidez; emagrecimento acentuado e prostração. Nos casos graves, os pacientes podem apresentar dispneia, hemoptise maciça, e empiema (GUTIERREZ et al., 2001).

As formas extrapulmonares podem ocorrer isoladamente ou concomitantes com a TB pulmonar. Dentre as mais frequentes, estão: pleural, linfática, osteoarticular, peritoneal, pericárdica, ganglionar, geniturinária, meníngea, oftálmica, cutânea e intestinal, embora praticamente qualquer local do organismo possa ser afetado pela doença (GUTIERREZ et al., 2001; LOPES et al., 2006). Com o advento da aids, estas formas tiveram grande aumento na sua incidência, acometendo cerca de 50% dos pacientes coinfectados por TB/HIV (SHARMA; MOHAN, 2004a).

### 2.2.2 Tratamento

O tratamento da TB é ambulatorial, baseado em poliquimioterapia e visa eliminar o foco da infecção e interromper a cadeia de transmissão da doença. O esquema de primeira linha utiliza os fármacos isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol por um período de dois meses, seguido do uso de rifampicina e isoniazida por mais quatro meses. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente têm alta eficácia e são os meios para evitar a persistência bacteriana e a seleção de cepas resistentes aos fármacos. O esquema de tratamento atual tem índices de cura de cerca de 90% em casos de tuberculose causada por cepas sensíveis aos fármacos em pacientes HIV-soronegativos que seguem corretamente o tratamento (BRASIL, 2010; LOBUE; ENARSON; THOEN, 2010; WHO, 2015a; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

Entretanto, o tratamento da TB é desafiador. A terapia a longo prazo, somada aos efeitos adversos dos medicamentos, à toxicidade e às interações farmacocinéticas (especialmente com a terapia antirretroviral em pacientes coinfectados com HIV), contribui para a não adesão do paciente ao tratamento. Cepas resistentes surgem a partir de mutações cromossômicas espontâneas em taxas que são previsíveis para cada fármaco; o uso inadequado dos fármacos resulta em pressão seletiva e, conseqüentemente, aumento do número de casos de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos e falência do tratamento. Casos de resistência primária também ocorrem quando estas linhagens resistentes selecionadas são transmitidas a outros indivíduos (ZUMLA et al., 2013). Com o objetivo de aumentar as taxas de cura e reduzir as taxas de abandono ao tratamento, foi instituído o TDO, em que profissionais capacitados devem observar a tomada da medicação do paciente desde o início do tratamento até a sua cura (BRASIL, 2011).

Em casos de resistência, no Brasil, são adotadas prioritariamente estratégias de tratamento padronizado. Em casos de monorresistência (resistência à rifampicina ou isoniazida) e polirresistência (resistência à rifampicina ou isoniazida e mais outro fármaco), devem ser adotados protocolos de acordo com o(s) fármaco(s) ao(s) qual(is) há a resistência (BRASIL, 2011). As cepas resistentes a múltiplos fármacos (TB-MDR, resistentes à rifampicina e isoniazida ou a estes e outros fármacos de primeira linha) e as cepas extensivamente resistentes (TB-XDR, resistentes à rifampicina, isoniazida, qualquer fluoroquinolona e mais um dos três fármacos injetáveis de segunda linha

– amicacina, canamicina e capreomicina) requerem esquemas de tratamento mais longos, com a utilização de fármacos de segunda linha, associados a altos riscos de intolerância e alta toxicidade, além de serem menos efetivos e de alto custo (LOBUE, ENARSON & THOEN, 2010). O tratamento de cepas MDR pode ser realizado com base em protocolos padronizados ou com base na opinião de especialistas no assunto, podendo ser também realizados de forma individualizada, de acordo com os resultados obtidos nos testes de susceptibilidade aos fármacos. Entretanto, este tipo de teste, principalmente para fármacos de segunda linha, não está disponível em diversas regiões onde a TB é endêmica (ZUMLA et al., 2013). No Brasil, utiliza-se o esquema SELZT (estreptomicina, etambutol, levofloxacina, pirazinamida e terizidona), com duração de 18 meses a 24 meses, dependendo da curva de negatificação bacteriológica, evolução clínica e radiológica. Já nos casos de TB-XDR, o tratamento é muito difícil e deve ser individualizado com fármacos de reserva e avaliado por profissionais experientes no manejo deste tipo de paciente (BRASIL, 2011; ZUMLA et al., 2013).

O tratamento da TB latente baseia-se no uso de isoniazida por um período de 6 a 9 meses. Sua indicação é estabelecida de acordo com o resultado do teste tuberculínico e com o risco de adoecimento, associado principalmente à competência do sistema imunológico. Dentre as prioridades, encontram-se os pacientes infectados pelo HIV. Doenças ou tratamentos imunodepressores, idade – menor do que 2 anos ou maior que 60 anos – e desnutrição também são fatores que devem ser considerados para a decisão de iniciar o tratamento da TB latente (BRASIL, 2011; ZUMLA et al., 2013).

### **2.2.3 Epidemiologia**

Atualmente, a TB e a infecção pelo HIV são consideradas as principais causas de morte no mundo. Estima-se que aproximadamente a terça parte da população mundial abrigue o bacilo da TB. Em 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de 9,6 milhões de novos casos da doença, sendo 5,4 milhões em homens, 3,2 milhões em mulheres e um milhão em crianças. Do total de casos, 12% ocorreram em pacientes HIV-soropositivos. Também foram estimados cerca de 1,5 milhões de óbitos devido à TB neste mesmo ano, sendo 400.000 em indivíduos HIV-soropositivos. Quanto ao tratamento, 86%

dos novos casos da doença foram curados no ano de 2013, índice que vem se sustentando desde 2005 (WHO, 2015a).

A OMS classifica os países com alta carga de TB pelo número absoluto de casos novos da doença, sendo Índia, Indonésia e China os três primeiros da lista. O Brasil ocupa o 18º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo (*High-Burden Countries* – HBCs), com uma média de 33,2 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2015a; BRASIL, 2016).

No Brasil, a TB é considerada um grande problema de saúde pública. As maiores incidências no ano de 2015 deram-se nos Estados do Amazonas (71,2 casos/100.000 habitantes), Rio de Janeiro (61,8 casos/100.000 habitantes), Pernambuco (46,1 casos/ 100.000 habitantes) e Rio Grande do Sul (41,0 casos/ 100.000 habitantes) (BRASIL, 2016). Em Santa Catarina, foram notificados, no ano de 2014, 1.906 casos novos de TB. O Estado encontra-se entre aqueles com as mais baixas taxas de incidência da doença (28,3/100.000 habitantes), porém, a distribuição dos casos é heterogênea. As Regiões de Saúde de Foz do Rio Itajaí, Grande Florianópolis, Nordeste, Carbonífera e Laguna possuem as mais altas incidências do Estado, variando entre 30 e 60 casos por 100.000 habitantes. A taxa de coinfeção com HIV no Estado é de 18,8% (DIVE, 2016).

Estima-se que 3,3% dos novos casos de TB e 20% dos casos de retratamento sejam de TB-MDR. Para o ano de 2014, estimou-se ocorrência mundial de 480.000 casos e 190.000 mortes devido a esta doença. Desses casos, apenas 50% completaram o tratamento com sucesso. Casos de TB-XDR foram reportados em 105 países até o ano de 2015. Estima-se que 9,7% dos casos de TB-MDR sejam TB-XDR (WHO, 2015a). De acordo com Zumla e colaboradores (2013), a taxa de mortalidade nos casos de TB-XDR pode chegar a 98% em pacientes coinfectados com HIV. A emergência das cepas resistentes aos fármacos reflete as deficiências no controle da TB, o que dificulta o tratamento e a prevenção e aumenta os desafios para o controle da doença (WHO, 2015a).

Após declarar a TB uma emergência global, a OMS vêm lançando planos de abrangência global, durante os últimos 20 anos, com o objetivo de reverter a situação epidêmica da doença. O primeiro deles, a estratégia DOTS (do inglês, *Directly Observed Treatment Short* - Estratégia do Tratamento Direto Observado da Tuberculose), foi lançada em 1994, enquanto Plano Global Stop TB foi lançado em 2001 (Stop TB 2001-2005). O terceiro deles, a Estratégia Stop TB 2006-2015, teve como objetivos reverter a incidência da TB até 2015, por meio da

expansão da Estratégia do Tratamento Diretamente Observado da Tuberculose (DOTS), da detecção de resistência aos tuberculostáticos, de ações de grupos de trabalho na coinfeção TB/HIV e no desenvolvimento e avaliação de novos fármacos, vacinas e metodologias diagnósticas. Seus principais objetivos eram reduzir as taxas de prevalência da TB e de óbitos devidos à doença em 50%, em comparação às taxas de 1990, até 2015, e reduzir a incidência anual global de TB ativa para <1 caso por 1 milhão de habitantes até 2050 (WHO, 2006). Apesar de todos os esforços, o controle global da doença vem progredindo lentamente, com uma redução média da incidência de 2% ao ano. Em 2014, foi lançada a Estratégia End TB, relativa à era pós-2015, que visa acabar com a epidemia da TB até 2035. Dentre os principais objetivos, estão reduzir em 90% o número de mortes causadas pela TB até 2030, em comparação com o ano de 2015, além de reduzir em 80% o número de casos novos e reduzir os “efeitos catastróficos” da TB nas famílias atingidas pela doença. Esta estratégia baseia-se em três pilares: enfatizar os cuidados e prevenção focados no paciente, reforçar políticas públicas e intensificar pesquisas e inovação (WHO, 2015a).

### 2.3 MICOBACTERIOSES

As MNT podem causar uma variedade de doenças chamadas micobacterioses, que diferem em gravidade e importância para saúde pública de acordo com sua virulência. Este grupo é responsável por um amplo espectro de manifestações, que inclui infecções pulmonares crônicas e progressivas, infecções de pele e tecidos moles, infecções gastrointestinais, linfadenites em crianças e, especialmente em pacientes imunossuprimidos, infecções disseminadas (KATOCH, 2004).

O pulmão é o órgão mais frequentemente acometido pelas MNT. A doença pulmonar ocorre pela inalação de aerossóis contendo os bacilos, geralmente em pacientes com doença pulmonar pré-existente, como por exemplo, fibrose cística, bronquiectasia e silicose. As principais espécies relacionadas à doença pulmonar são *M. avium*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. xenopi* e *M. malmoense*, sendo as duas últimas mais frequentes na Europa. Além disso, doenças disseminadas causadas por *M. avium* têm grande importância em indivíduos vivendo com HIV (ARENDE; van SOOLINGEN; OTTENHOFF, 2009; GRIFFITH, 2010; JOHNSON; ODELL, 2014).

Além da inalação de aerossóis, outra forma de transmissão das MNT é a inoculação pós-traumática. A habilidade das MNT de sobreviver e multiplicar-se em fluidos aquosos e em alguns desinfetantes (como o glutaraldeído) as torna potenciais agentes de infecções hospitalares e causadoras de surtos importantes. Falhas nos procedimentos de descontaminação de instrumentos ou equipamentos cirúrgicos têm sido apontadas como principais fatores desencadeantes do processo infeccioso. Com isso, pode ocorrer infecção por quebra da barreira corneana, cutânea ou mucosa, decorrente de procedimentos médicos para fins terapêuticos (cirurgias oftalmológicas, laparoscópicas e endoscopia, por exemplo) ou para fins estéticos (cirurgias plásticas e implantes). Este tipo de infecção acomete a pele e outros tecidos moles e está normalmente associado às micobactérias de crescimento rápido (principalmente *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*), mas pode também ser causado por micobactérias de crescimento lento, como *M. avium* e *M. xenopi* (DUARTE et al., 2009; COOK, 2010).

As doenças causadas por MNT não são de notificação compulsória, ao contrário da TB. Por isso, poucos são os dados oficiais referentes às micobacterioses. Grande parte dos dados baseia-se em estudos realizados a partir do isolamento de MNT em laboratório, principalmente em países da América do Norte, Europa e Japão. Apesar dos dados de incidência e de prevalência reais não serem conhecidos, esses estudos foram capazes de demonstrar um aumento significativo no isolamento de MNT nas últimas décadas. Isto ocorreu devido a um conjunto de fatores: maior informação e atenção dos médicos, avanços na detecção laboratorial de micobactérias e aumento da população de risco e da exposição ambiental às MNT (AREND; van SOOLINGEN; OTTENHOFF, 2009; COOK, 2010; JOHNSON; ODELL, 2014).

Em países desenvolvidos, nos quais a incidência de TB encontra-se em decréscimo e em fase de estabilização, os índices de infecção por MNT estão muito próximos ou até já ultrapassam aqueles de TB (AREND; van SOOLINGEN; OTTENHOFF, 2009; JOHNSON; ODELL, 2014). Marras e colaboradores (2007) reportaram um aumento no número de isolados de MNT de origem pulmonar em Ontário, Canadá, de 9,1/100.000 habitantes em 1997 para 14,1/100.000 habitantes em 2003. Durante o mesmo período, a prevalência de TB apresentou redução nos seus valores. Já em países em desenvolvimento, nos quais os índices de TB são maiores, as doenças causadas por MNT têm menor reconhecimento, principalmente devido às altas taxas de TB e, provavelmente, à realização de diagnóstico clínico, imagético ou por baciloscopia, sem cultivo e identificação da bactéria. Entretanto,

também podem ser encontradas em ascensão desde que devidamente investigadas (COOK, 2010).

Surtos importantes estão relacionados às MCR, causando infecções de pele e tecidos moles. No Brasil, surtos associados a esse tipo de MNT têm sido relatados desde 1998 (DUARTE et al., 2009). No período de 2000 a 2008, foram notificados 2.128 casos de infecção por MCR no país, relatados principalmente nos Estados do Rio de Janeiro (1.105 casos), Pará (321 casos), Espírito Santo (293 casos), Rio Grande do Sul (101 casos) e Goiás (70 casos) (RENISS, 2009). O agente etiológico mais comum foi *M. massiliense* (nomenclatura substituída por *M. abscessus subsp. bolletii*), com exceção dos casos de infecção secundários a mamoplastias, nos quais *M. fortuitum* foi mais frequente. Em 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou em Nota Técnica a notificação compulsória das infecções causadas por MCR, decorrentes de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou cosmiátricos) realizados em serviços de saúde do Brasil, sejam eles públicos ou privados (BRASIL, 2009).

O tratamento das micobacterioses é bastante complexo e desafiador, uma vez que as MNT são naturalmente resistentes ou têm pouca sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento da TB. Esta sensibilidade ainda difere entre as espécies e entre cepas de uma mesma espécie. Por esta razão, para um tratamento eficiente, é necessário, inicialmente, fazer a identificação do agente causal, para que, de acordo com a sua sensibilidade, sejam escolhidos os fármacos a serem utilizados. Assim como no tratamento da TB, devem ser combinados pelo menos dois fármacos, visando evitar a seleção de cepas resistentes. Muitos são os esquemas utilizados para o tratamento das MNT, entretanto, ainda são poucos os estudos randomizados relacionados a este tema para grande parte das espécies. Além disso, a toxicidade dos fármacos utilizados e a longa duração dos esquemas, de no mínimo 18 meses, dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento e fazem com que nenhum dos esquemas seja considerado satisfatório (GRIFFITH, 2010; JOHSON; ODELL, 2014).

Visando facilitar a conduta terapêutica, a *American Thoracic Society* (ATS/USA) e a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA/USA) elaboraram, em 2007, diretrizes referentes ao diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças causadas por MNT (*An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases*). Em relação ao tratamento, propõem esquemas para as principais espécies relatadas como causadoras de doença; trazem recomendações para a escolha da

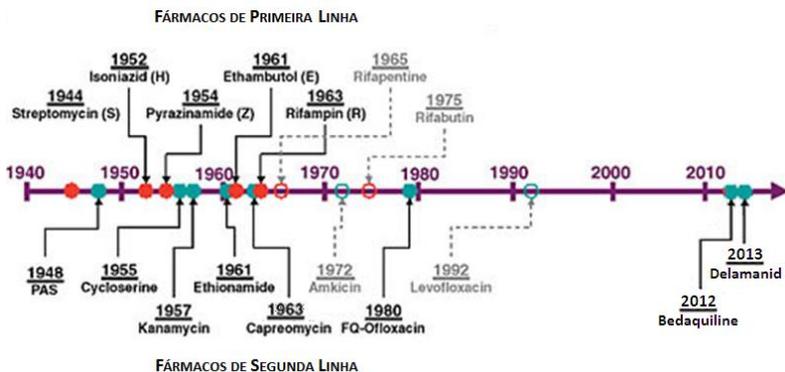
execução de testes de sensibilidade *in vitro*, principalmente devido à falta de correlação *in vitro* e *in vivo* de alguns fármacos e espécies; e trazem recomendações para o monitoramento e a duração do tratamento, que deve ser continuado por no mínimo 12 meses após a negatificação da cultura (GRIFFITH et al., 2007).

## 2.4 NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Importantes avanços foram obtidos nos últimos 10 anos para o aumento da efetividade do tratamento da TB, especialmente com a adoção da estratégia DOTS pelos Programas Nacionais de Controle da Tuberculose. Entretanto, os esquemas de tratamento disponíveis não são considerados ideais. A adesão ao tratamento permanece um dos desafios no combate à doença, enquanto casos de TB-MDR e XDR ainda são a maior ameaça para o controle da doença (WHO, 2015a). Desde o início da utilização da rifampicina, em 1966, passaram-se cinco décadas sem a introdução de um novo fármaco ao tratamento de primeira linha da TB. Já os fármacos bedaquilina e delamanida surgiram como novas alternativas para o tratamento da TB-MDR em adultos, e tiveram seu uso aprovado nos anos de 2012 e 2013, respectivamente (GINSBERG, 2010; WHO, 2015a). A figura 1 mostra a linha do tempo da descoberta dos fármacos utilizados no tratamento atual de primeira e segunda linha.

O desenvolvimento de novos fármacos e novos esquemas terapêuticos para TB é considerado urgente, devido à necessidade de (a) esquemas mais curtos, simples e acessíveis, que permitam um aumento na adesão ao tratamento e prevenção do desenvolvimento de cepas resistentes; (b) esquemas mais curtos, mais eficazes, menos tóxicos e mais baratos para o tratamento de TBMR e TB-XDR; (c) esquemas mais curtos, toleráveis e seguros para o tratamento da TB latente, permitindo o tratamento de pacientes que atuam como reservatórios de futuros casos de TB ativa; (d) fármacos com mínimas interações com as enzimas do citocromo P450 e outros sistemas metabólicos, a fim de otimizar e facilitar o tratamento de pacientes HIV-soropositivos em terapia antirretroviral (GINSBERG, 2010).

**Figura 1.** Linha do tempo da descoberta dos fármacos utilizados no atual tratamento de primeira e segunda linhas da tuberculose.



As linhas pontilhadas indicam os fármacos que não são os primeiros de sua classe. Os pontos vermelhos indicam os fármacos utilizados no tratamento de primeira linha. Adaptado de GINSBERG (2008).

A descoberta de novos fármacos representa um desafio em relação à atividade antimicobacteriana, uma vez que as micobactérias são organismos de crescimento lento cuja parede celular rica em lipídeos representa verdadeira proteção contra agentes agressores. Ainda, a alta lipofilicidade de alguns dos compostos mais ativos frente a *M. tuberculosis* reduz sua solubilidade aquosa e sua potencial biodisponibilidade por via oral. Entretanto, esta parede celular única e a maquinaria enzimática utilizada para sua síntese são considerados também alvos viáveis e específicos para o desenvolvimento de novos fármacos (SALOMON; SCHMIDT, 2012; RAWAT; RAWAT, 2013).

O estabelecimento de um esquema de tratamento mais curto e efetivo para a TB ainda é dificultado pela presença de bacilos persistentes nas lesões pulmonares, os quais são fenotipicamente tolerantes aos fármacos e são responsáveis pelos longos períodos de tratamento. De forma diferente da resistência genética, a tolerância fenotípica aos fármacos corresponde a um estado bacteriano transitório no qual muitos antimicrobianos são inefetivos. Isto ocorre devido à existência de subpopulações bacterianas geneticamente suscetíveis aos antimicrobianos, mas que estão em estado não-replicativo e, por isso, são refratárias à ação dos fármacos (LEVIN; ROZEN, 2006; WARNER; MIZRAHI, 2006). Apesar do aumento no número de estudos referentes

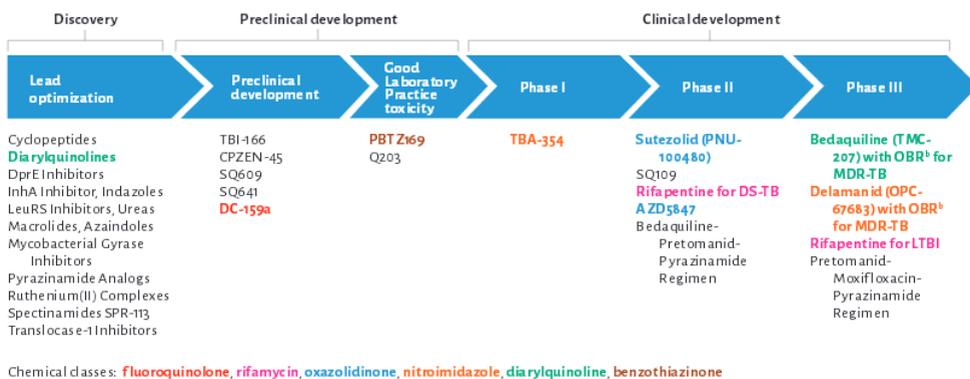
à pesquisa de compostos com atividade antimicobacteriana, estes geralmente utilizam técnicas que permitem a avaliação da atividade somente em bactérias em fase exponencial de crescimento. Entretanto, a pesquisa da atividade antimicobacteriana em bactérias em estado não-replicativo é especialmente importante para o tratamento da TB, principalmente quando se considera a necessidade de redução do tempo de tratamento. A introdução da pirazinamida no esquema de tratamento de primeira linha, por exemplo, possibilitou a redução do tempo de tratamento de 9 para 6 meses, justamente pelo fato de este fármaco atuar neste tipo de subpopulação. Entretanto, a pirazinamida é o único fármaco no tratamento de primeira linha que atua em bactérias em estado de latência. Ainda assim, outros fármacos com a mesma característica de atividade, mas com alvos moleculares diferentes, são desejáveis (ZHANG; MITCHISON, 2003; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

Após quase 40 anos de limitados esforços e recursos voltados à investigação de novas formas de tratamento da TB, investimentos significativos feitos por pesquisadores, agências de financiamento e instituições como a OMS, nos últimos dez anos, impulsionaram a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos. A resistência aos fármacos utilizados no tratamento atual da TB estimula a investigação de substâncias de diferentes classes químicas na busca por fármacos com novos mecanismos de ação, que sejam igualmente eficazes contra cepas de *M. tuberculosis* sensíveis, MDR e XDR. Como exemplos, pode-se citar quinolinas, diaminas, quinilonas, nitroimidazóis, terpenóides, oxazolidinonas e purinas, que já vêm sendo explorados como alternativas aos atuais fármacos (GINSBERG, 2010; RAWAT; RAWAT, 2013; WHO, 2015a). Atualmente, existem oito fármacos em estudos clínicos de fase I, II ou III para o tratamento de TB sensível, MDR ou latente. A figura 2 apresenta os fármacos em estudo de fase clínica e os principais compostos em fase pré-clínica de desenvolvimento. Pela primeira vez em seis anos, um novo candidato entrou em estudos clínicos de fase I: TBA-354, nitroimidazol pertencente à mesma classe de delamanida e pretomanida (PA-824). Estes fármacos em estudo também podem ser classificados em três grupos: (1) novos fármacos desenvolvidos para o tratamento da TB, como bedaquilina e SQ-109; (2) fármacos pertencentes ao esquema de primeira linha do tratamento de TB reavaliados para otimizar sua eficácia, como a rifapentina e (3) fármacos utilizados com outras indicações e compostos da mesma classe química propostos para o tratamento da TB, como gatifloxacino e moxifloxacino, sutezolida, pretomanida, delamanida e

AZD-5847 (GINSBERG, 2010; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013; WHO, 2015a).

Dentre os fármacos que se encontram em estudos clínicos, a bedaquilina (TMC-207) destaca-se por apresentar um mecanismo de ação singular. Enquanto grande parte dos fármacos atua inibindo a síntese da parede celular das micobactérias, a bedaquilina atua inibindo a enzima ATP-sintase. Estudos demonstraram que este fármaco tem potência equivalente à rifampicina e à isoniazida e, devido ao mecanismo de ação, é ativo contra cepas sensíveis, MDR e também contra bactérias em estado de latência (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

**Figura 2.** Fármacos em estudo de fases pré-clínica e clínica para o tratamento da tuberculose.



<sup>a</sup> Details for projects listed can be found at <http://www.newtdrugs.org/pipeline.php> and ongoing projects without a lead compound series identified can be viewed at <http://www.newtdrugs.org/pipeline-discovery.php>

<sup>b</sup> OBR = Optimized Background Regimen

## 2.5 PRODUTOS NATURAIS E O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Produtos naturais representam importantes fontes para o desenvolvimento de novos fármacos. Isto é especialmente evidente na área de doenças infecciosas, em que metabólitos secundários e seus análogos sintéticos tornaram-se indispensáveis no desenvolvimento de fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Acredita-se que o sucesso de produtos naturais como moléculas líderes no desenvolvimento de novos fármacos

seja devido à sua “pré-validação biológica”: organismos produzem metabólitos secundários que, ao longo da evolução, foram modificados para que fossem capazes de interagir com alvos biológicos. Uma vez que o processo evolutivo selecionou compostos que modulam funções protéicas, pode-se dizer que os produtos naturais representam moléculas com estruturas químicas com relevância biológica (DOBSON, 2004).

A TB é uma doença que atinge a humanidade há milênios. Além de evidências de DNA de *M. tuberculosis* em fósseis humanos datando de mais de 9.000 anos, análises de textos médicos de civilizações antigas, como egípcia (1550 a.C) e chinesa (2700 a.C.), sugerem que o homem vem utilizando produtos medicinais para tratar TB e outras infecções pulmonares, derivados principalmente de plantas, por milhares de anos (HERSHKOVITZ et al., 2008; SALOMON; SCHMIDT, 2012). Ainda, estudos etnofarmacológicos de plantas, animais e fungos utilizados por curandeiros na prática da medicina tradicional, principalmente do continente africano, identificaram diversos produtos naturais com potente atividade frente a *M. tuberculosis* (McGAW et al., 2008a; TABUTI; KUKUNDA; WAAKO, 2010).

Produtos naturais vêm desempenhando um papel importante no tratamento da TB. Dois dos quatro fármacos utilizados no tratamento de primeira linha, isoniazida e rifampicina, são compostos sintéticos derivados de produtos naturais: nicotinamida e rifamicina, respectivamente. Além disso, a estreptomicina, primeiro fármaco utilizado para o tratamento da TB, além dos fármacos de segunda linha amicacina, canamicina e capreomicina, também foi obtida de fontes naturais. Compostos com atividade frente a *M. tuberculosis* ainda vêm sendo isolados de uma variedade de fontes naturais com grande diversidade de estruturas químicas. Enquanto plantas continuam fornecendo um elevado número de novos metabólitos secundários, bactérias, fungos e animais marinhos invertebrados também se tornaram importantes fontes de produtos naturais com atividade antimicrobacteriana. Dentre as classes químicas destes compostos, pode-se destacar alcanos, quinonas e compostos fenólicos, alcalóides, peptídeos, terpenos (monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos) e esteróides. Apesar do longo tempo sem introdução de novos fármacos no tratamento da TB provenientes de fontes naturais, produtos naturais continuam sendo importantes fontes de novos inibidores de *M. tuberculosis* e são promissoras fontes de novos farmacóforos para o desenvolvimento de novos fármacos para TB

(GUZMÁN et al., 2012; SALOMON; SCHMIDT, 2012; MDLULI;KANEKO; UPTON, 2015; NGUTA et al., 2015).

## 2.6 GÊNERO *CALEA*

*Calea* é um amplo gênero pertencente à família Asteraceae, que engloba 148 espécies de plantas, ocorrentes em regiões tropicais e subtropicais do continente americano (ROQUE; CARVALHO, 2011; THE PLANT LIST, 2016). No Brasil, 53 espécies estão amplamente distribuídas pelo território nacional, principalmente nos estados de Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (ROQUE; CARVALHO, 2011).

As espécies deste gênero contêm germacranolídeos, subgrupo de lactonas sesquiterpênicas (LS), como componente químico em comum (FERREIRA et al., 1980; MARCHETTI et al., 2012). Estudos fitoquímicos conduzidos com diferentes espécies relataram também a presença de acetofenonas (BOHLMANN et al., 1981), derivados do timol (MALDONADO; MARQUEZ, ORTEGA, 1992), cromenos (STEINBECK et al., 1997), flavonóides (NASCIMENTO; SILVA; OLIVEIRA, 2002) e benzofuranos (OBER; FRONCZEK; FISCHER, 1985) como componentes majoritários deste gênero.

Diversas espécies do gênero *Calea* são empregadas popularmente para tratamento de problemas digestivos. Entretanto, estudos utilizando extratos e compostos isolados de diversas espécies evidenciaram variadas atividades biológicas e farmacológicas, como atividades hipoglicemiante (RAMOS et al., 1992), leishmanicida (WU et al., 2011), antifúngica (FLACH et al., 2002), genotóxica (FERRAZ et al., 2009), antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2004), antitumoral (MARQUETTI et al., 2012) e antiinflamatória (GOMES; GIL, 2011).

Neste trabalho, foram estudados extratos e compostos isolados de *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida*. A espécie *C.uniflora*, conhecida popularmente como arnica da praia, é empregada na medicina popular devido às suas propriedades antiinflamatórias (SIMIONNATO et al., 2016). Quanto às atividades farmacológicas, Nascimento e colaboradores (2002) relataram a atividade tripanocida de cromenos isolados desta espécie, além da atividade tripanocida e antifúngica de acetofenonas (NASCIMENTO et al., 2004) e atividade leishmanicida de cromanonas (NASCIMENTO et al., 2007).

Já a espécie *C. pinnatifida*, conhecida popularmente como aruca, cipó-cruz ou quebra-tudo, é empregada popularmente no tratamento de problemas digestivos, amebíase e giardíase (MARCHETTI et al., 2012). Marchetti e colaboradores (2012) relataram a atividade antitumoral do extrato bruto diclorometano, enquanto Lima e colaboradores (2015) relataram a atividade leishmanicida de cromenos extraídos desta espécie.

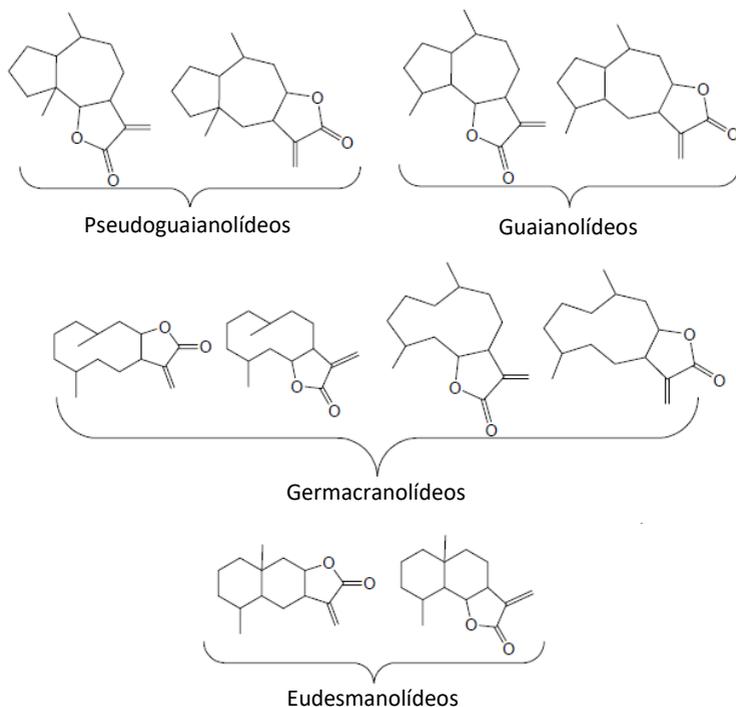
## 2.7 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

As LS constituem um amplo e variado grupo de metabólitos secundários pertencentes à classe dos sesquiterpenóides. Seu esqueleto é constituído por 15 carbonos, derivados da condensação de três fragmentos isopreno (2-metil-1,3-butadieno, composto por 5 carbonos) e da fusão de um anel lactônico (éster cíclico). Este anel geralmente possui 5 membros ( $\gamma$ -lactona), com uma ligação dupla conjugada (exo ou endocíclica) ao grupamento carbonila, resultando em uma  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (SANTOS, 1989; CHATUVERDI, 2011).

Estes compostos são classificados de acordo com o arrajando de seu esqueleto carbocíclico. Embora já tenham sido relatados mais de 30 diferentes tipos de carboesqueletos, as LS podem ser classificadas em quatro principais grupos: germacranolídeos, principal grupo de LS, formados por um anel de 10 membros; eudesmolídeos, formados por dois anéis de 6 membros fundidos; guaianolídeos, com um anel de 5 membros fundido a um anel de 7 membros e um substituinte metil em C4; e pseudoguaianolídeos, que apresentam as mesmas características que os guaianolídeos, mas com o substituinte metil em C5 (figura 3) (HOFFMANN, 2003).

As LS já foram identificadas em diversas espécies vegetais pertencentes a diversas famílias, como Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Rutaceae, Winteraceae e Hepatideae. Entretanto, são encontradas e sua maioria em plantas da família Asteraceae (Compositae), na qual já foram reportadas mais de 3.000 estruturas diferentes e da qual são consideradas marcadores taxonômicos. Nesta família, encontram-se concentradas nas partes aéreas, principalmente nas folhas e nos capítulos, e sua concentração por peso seco pode variar entre 0,01% a 8% (SCHMIDT, 1999; CHATUVERDI, 2011).

**Figura 3.** Carboesqueleto dos principais grupos de lactonas sesquiterpênicas.



Fonte: CHATUVERDI (2011).

Compostos pertencentes a este grupo podem desencadear reações alérgicas e toxicidade, tanto em humanos quanto em animais herbívoros, e podem ser considerados como um mecanismo de proteção das plantas que os contêm. Entretanto, diversas plantas têm seu uso popular associado com a presença de LS. Por exemplo, a LS absintina está associada com a atividade anti-helmíntica de *Artemisia absinthium*, enquanto partenolídeo é o principal princípio ativo de *Tanacetum parthenium*, utilizada no tratamento de enxaqueca (HOFFMANN, 2003).

Além do uso popular, este grupo de metabólitos é comumente relacionado com uma grande diversidade de atividades biológicas (HOFFMANN, 2003; GHANTOUS et al., 2010; CHATUVERDI, 2011). A utilização de extratos de plantas ricas em LS tem ganhado

importante atenção para o tratamento de inflamação, enxaqueca e infecções. As atividades antiinflamatória e antitumoral desta classe de compostos já foram reportadas em mais de 1.500 publicações, sendo cerca de 90% destas publicadas a partir da década de 1990 (GHANTOUS et al., 2010). Dentre as LS com atividade antitumoral, paternolídeo encontra-se em estudos clínicos de fase I (FERRUCCI et al., 2016), enquanto tpsigargina encontra-se em estudos clínicos fase II (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016). O artesunato, derivado semissintético da artemisinina, também chegou a estudos clínicos fase I (ERICSSON et al., 2014; KÖNIG et al., 2016).

A atividade antifúngica das LS já foi demonstrada frente a diversas espécies, como *Aspergillus niger*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichoderma viride*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium sp.* e *Helminthosporium sp.* (CALERA et al., 1995; SKAL TSA et al., 2000; DURAI PANDIYAN et al., 2012). Já LS como a artemisinina e seu derivado artesunato apresentaram atividade frente ao vírus causador da hepatite B (HBV) (ROMERO et al., 2005), enquanto partenolídeo e helenalina apresetaram atividade frente ao vírus causador da hepatite C (HCV) (HWANG et al., 2006).

As LS também têm atividade bastante relatada como agentes antibacterianos, mostrando-se particularmente ativas contra bactérias Gram-positivas, embora também possuam menor atividade contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (TAYLOR; TOWERS, 1998; RABE; MULLHOLLAND; van STADEN, 2002; CHATUVERDI et al., 2011). A atividade antimicobacteriana também já foi relatada por diversos autores, com mais frequência frente a *M. tuberculosis* (FISCHER et al., 1998; VONGVANICH et al., 2006; LUNA-HERRERA et al., 2007; CORONADO-ACEVES et al., 2016), mas também frente a MNT, como *M. avium* (FISCHER et al., 1998).

Dentre todas as atividades biológicas de LS, a mais conhecida é a antimalária. Em 1972, um grupo de pesquisadores chineses foi responsável pelo isolamento da artemisinina, LS obtida da fração hexano de extratos de *Artemisia annua* (Asteraceae), planta utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de febre e malária desde os tempos antigos (KLAYMAN, 1985). A artemisinina e seus derivados são conhecidos por sua habilidade de reduzir rapidamente, em cerca de três dias, a carga parasitária de pacientes com malária, além de apresentar baixas taxas de desenvolvimento de resistência (CUI; SU, 2009). Atualmente, as terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs, do inglês *artemisinin-based combination therapies*) são

recomendadas pela OMS como tratamento de primeira linha para casos não complicados de malária causados por *Plasmodium falciparum*. A expansão do acesso aos ACTs em países em que a malária é endêmica tem sido de importância fundamental para o recente sucesso na redução mundial dos casos da doença. Em 2013, por exemplo, foram realizados 392 milhões de tratamentos à base de artemisinina em países endêmicos, em comparação com 11 milhões realizados no ano de 2005 (WHO, 2015b). A descoberta da artemisinina foi considerada uma das grandes descobertas do século XX e foi responsável pela premiação de Youyou Tu com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2015 (THE NOBEL ASSEMBLY AT KAROLINSKA INSTITUTET, 2015).

### 3 JUSTIFICATIVA

O sequenciamento genômico de *M. tuberculosis* revelou a existência de mais de 4.000 genes e forneceu uma primeira visão sobre a capacidade metabólica desse microrganismo (COLE et al., 1998). Estudos de mutagênese ao longo do genoma de *M. tuberculosis* possibilitaram a identificação de genes essenciais para o crescimento da bactéria *in vitro* e vêm sendo utilizados para identificar e priorizar potenciais alvos para desenvolvimento de novos fármacos para tuberculose (TB) (SASSETTI; RUBIN, 2003). Apesar da ampla gama de informações disponíveis sobre este assunto, a busca por novos fármacos baseada em alvos moleculares (abordagens *target-based*) ainda não obteve o sucesso esperado na identificação de candidatos com relevância clínica para o tratamento da TB. Dentre os novos e promissores compostos e fármacos em estudos clínicos, bedaquilina, delamanida, pretomanida e SQ-109, nenhum foi originado de estudos que utilizaram abordagens *target-based*. Por isso, abordagens que não consideram alvos moleculares também são justificadas na pesquisa de novos compostos com atividade antimicobacteriana (SALOMON; SCHMIDT, 2012; WHO, 2015a). Ainda, segundo Guzman e colaboradores (2012), programas de triagem da biodiversidade química e projetos de bioprospecção devem continuar sendo estimulados se pretendemos continuar encontrando novos compostos e ter novas opções para o tratamento da TB no futuro.

A triagem de compostos utilizando-se abordagens *whole-cell* continua sendo uma ferramenta essencial na pesquisa de novos fármacos com atividade antimicobacteriana. Suas vantagens incluem a avaliação simultânea da permeabilidade pela parede celular de *M. tuberculosis* e da atividade em múltiplas proteínas, incluindo potenciais novos e ainda não-caracterizados alvos moleculares. O principal desafio desta abordagem é a subsequente determinação do alvo molecular e do mecanismo de ação dos compostos. Além de poder indicar alvos moleculares até então desconhecidos, a determinação do mecanismo de ação é capaz de fornecer um ponto de partida para a elaboração de análogos, seguindo-se as regras do planejamento racional de fármacos (GUZMAN et al., 2012; SALOMON; SCHMIDT, 2012).

A determinação do mecanismo de ação pode ser feita através de mapeamentos de resistência cruzada, seleção de mutantes resistentes aos compostos e sequenciamento do genoma para identificar mutações pontuais (SALOMON; SCHMIDT, 2012). Esta estratégia foi utilizada,

por exemplo, durante o processo de descobrimento da bedaquilina, fármaco que atualmente encontra-se em estudos clínicos fase III e tem grande reconhecimento devido ao seu novo mecanismo de ação (ANDRIES et al., 2005). A disponibilidade do sequenciamento genômico completo de *M. tuberculosis*, associada ao desenvolvimento de técnicas como o *microarray*, possibilitou também a avaliação da expressão gênica desses microrganismos. As alterações no perfil de expressão de genes de cepas de *M. tuberculosis* tratadas com compostos antimicobacterianos pode indicar as vias afetadas por estes compostos ou até mesmo seus alvos de ação específicos. Considerando-se a resistência aos fármacos utilizados no tratamento atual da TB e a consequente necessidade de novos fármacos com diferentes mecanismos de ação, a análise da expressão gênica de micobactérias frente a diferentes compostos é uma grande aliada para o reconhecimento de vias que possam ser exploradas como alvo de ação de novos fármacos (WILSON et al., 1999; FU, 2006).

A atividade antimicobacteriana ainda não foi relatada para extratos e compostos isolados das espécies vegetais *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida*. Como mencionado anteriormente, as plantas do gênero *Calea* apresentam como componente químico em comum os germacranolídeos, subgrupo da classe das lactonas sesquiterpênicas (FERREIRA et al., 1980; MARCHETTI et al., 2012). Considerando a grande diversidade de atividades biológicas já descritas para a classe das lactonas sesquiterpênicas (HOFFMANN, 2003; GHANTOUS et al., 2010; CHATUVERDI, 2011), incluindo a atividade antimicobacteriana (FISCHER et al., 1998; VONGVANICH et al., 2006; LUNA-HERRERA et al., 2007), e a importância da triagem de produtos naturais na pesquisa de novos fármacos para o tratamento da TB, as plantas *C. uniflora* e *C. pinnatifida* foram consideradas potenciais fontes de novos compostos com atividade antimicobacteriana, justificando seu estudo neste trabalho.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicobacteriana *in vitro* de extratos e compostos naturais isolados de *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida* e investigar seu mecanismo de ação.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem de extratos e compostos naturais isolados de *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida* quanto à atividade antimicobacteriana *in vitro*;
- Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) para os compostos que apresentarem atividade antimicobacteriana na triagem;
- Avaliar a citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) dos compostos e calcular seu Índice de Seletividade (SI);
- Avaliar a atividade antimicobacteriana dos compostos ao longo do tempo;
- Avaliar a ação dos compostos frente a isolados clínicos de micobactérias;
- Avaliar a atividade antimicobacteriana de compostos isolados em *Mycobacterium tuberculosis* em estado não-replicativo;
- Avaliar a combinação dos compostos isolados com os fármacos já utilizados no tratamento da tuberculose;
- Avaliar atividade antimicobacteriana em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*;
- Predizer, através de modelo *in silico*, o perfil físico-químico e farmacocinético dos compostos isolados com potencial atividade biológica;
- Avaliar as alterações envolvidas na expressão dos genes micobacterianos após tratamento com os compostos.



## 5 METODOLOGIA

Os ensaios descritos nos itens 5.3.6 (Ensaio da curva de tempo de morte), 5.3.9 (Avaliação da atividade bactericida frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo), 5.3.10 (Avaliação a atividade antimicobacteriana em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*) e 5.5 (Estudo do mecanismo de ação) foram executados no Laboratório de Segurança Biológica Nível 3 – Brighton and Sussex Medical School, University of Sussex, Reino Unido, durante o doutorado sanduíche, e o ensaio descrito no item 5.3.11 (Avaliação da atividade antimicobacteriana em estrutura granuloma-like) foi realizado no Laboratório de Imunobiologia (LIDI), do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/UFSC). Os demais ensaios foram executados no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM), do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

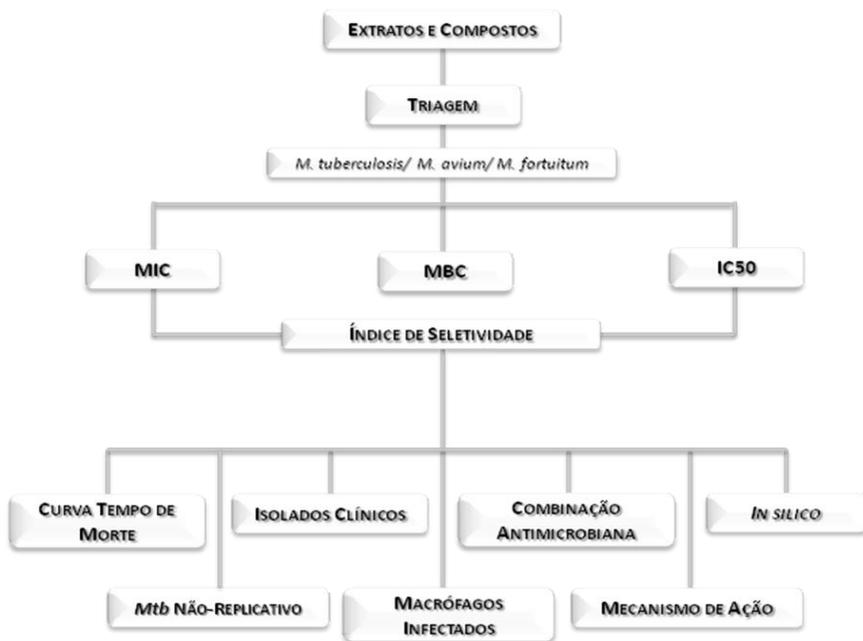
A figura 4 apresenta o fluxograma da metodologia utilizada ao longo do trabalho, de acordo com o descrito nos objetivos específicos (item 4.2).

### 5.1 EXTRATOS E COMPOSTOS

Os extratos e compostos isolados foram obtidos junto ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina, em colaboração com a professora Maique Weber Biavatti e a doutoranda Tamires Cardoso Lima. Inicialmente, foram testados extratos e compostos isolados obtidos das folhas de duas plantas do gênero *Calea* (Asteraceae): *C. uniflora* Less e *C. pinnatifida*. A partir do extrato etanólico bruto obtido de folhas frescas de cada uma das plantas, foram obtidas quatro diferentes frações, com diferentes níveis de polaridade, que foram testadas quanto à atividade antimicobacteriana: hexano, diclorometano, acetato de etila e residual aquosa. Isolados a partir destas, também foram testados dez compostos: 1 cromona, 1 chalcona, 1 ácido fenólico e 4 lactonas sesquiterpênicas (LS) de *C. uniflora* e 2 cromenos e 1 LS de *C. pinnatifida*. A figura 5 mostra o esquema de obtenção das frações dos extratos e dos compostos

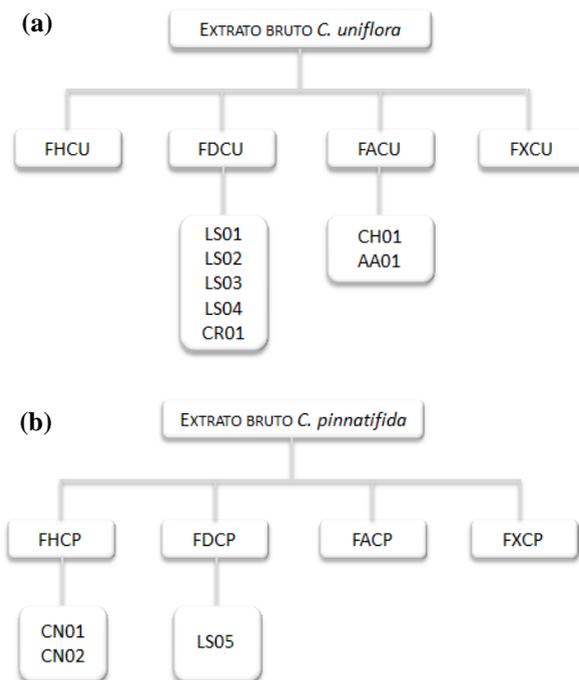
isolados e a tabela 1 traz as informações dos compostos isolados. As estruturas químicas dos compostos foram determinadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear em 1 e 2 dimensões (RMN 1D e RMN 2D) e podem ser visualizadas nas figuras 6 e 7. Adicionalmente, foram estudadas outras duas LS: 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo (LS06), isolada de *Hedyosmum brasiliense*, e diacetiltiptocarfol (LS07), isolada de *Vernonia scopioides*. As estruturas podem ser visualizadas na figura 8.

**Figura 4.** Fluxograma da avaliação dos compostos quanto à atividade antimicobacteriana *in vitro*.



MIC: concentração inibitória mínima. MBC: concentração bactericida mínima. IC<sub>50</sub>: concentração inibitória 50%. Fonte: a autora.

**Figura 5.** Esquema de obtenção das frações dos extratos e dos compostos isolados de (a) *Calea uniflora* e (b) *Calea pinnatifida*.



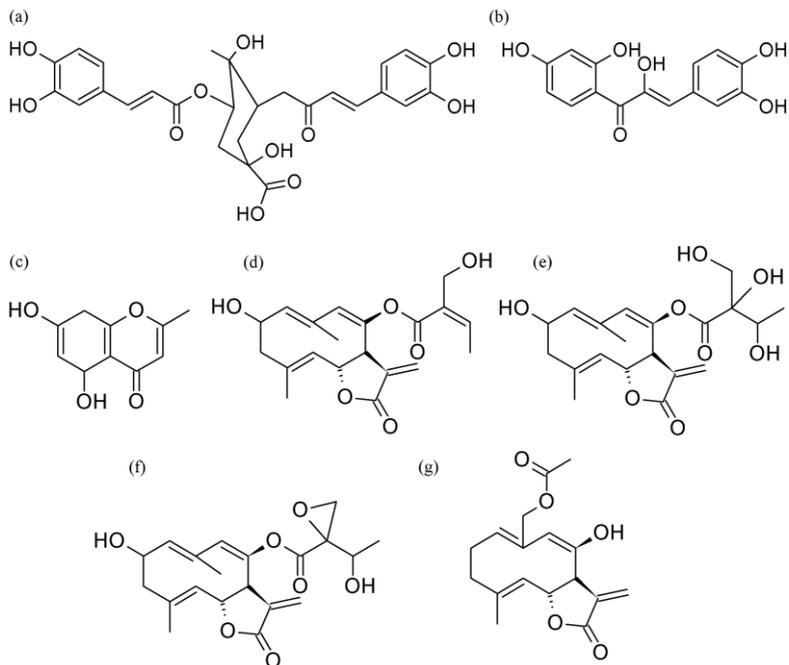
FHCU: fração hexano de *C. uniflora*; FDCU: fração diclorometano de *C. uniflora*; FACU: fração acetato de etila de *C. uniflora*; FXCU: fração residual aquosa (xade) de *C. uniflora*; FHCP: fração hexano de *C. pinnatifida*; FDCP: fração diclorometano de *C. pinnatifida*; FACP: fração acetato de etila de *C. pinnatifida*; FXCP: fração residual aquosa de *C. pinnatifida*. Fonte: a autora.

**Tabela 1.** Relação de compostos isolados de *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida* testados quanto à atividade antimicobacteriana *in vitro*.

<b>N</b>	<b>SIGLA</b>	<b>CLASSE</b>	<b>DENOMINAÇÃO</b>
<b>01</b>	<b>AA01</b>	Ácido fenólico	Ácido dicafeoil-quinico
<b>02</b>	<b>CH01</b>	Chalcona	2',4',3,4- $\alpha$ -pentahidroxicalcona
<b>03</b>	<b>CN01</b>	Cromeno	Eupatoriocromeno
<b>04</b>	<b>CN02</b>	Cromeno	Metileupatoriocromeno
<b>05</b>	<b>CR01</b>	Cromona	Noreugenina
<b>06</b>	<b>LS01</b>	Lactona sesquiterpênica	Desacetileupaserrina
<b>07</b>	<b>LS02</b>	Lactona sesquiterpênica	2- $\alpha$ -hidróxi- $\delta\beta$ -2',3',5'- trihidróxi-angeloilóxi- costunolídeo
<b>08</b>	<b>LS03</b>	Lactona sesquiterpênica	2- $\alpha$ -hidróxi- $\delta\beta$ -3'-hidróxi-2'5'- epoxiangeloilóxi-costunolídeo
<b>09</b>	<b>LS04</b>	Lactona sesquiterpênica	Ovatifolina
<b>10</b>	<b>LS05</b>	Lactona sesquiterpênica	11,13-dihidro-11,13-dihidroxi- ipliciolídeo-8 $\beta$ -metacrilato

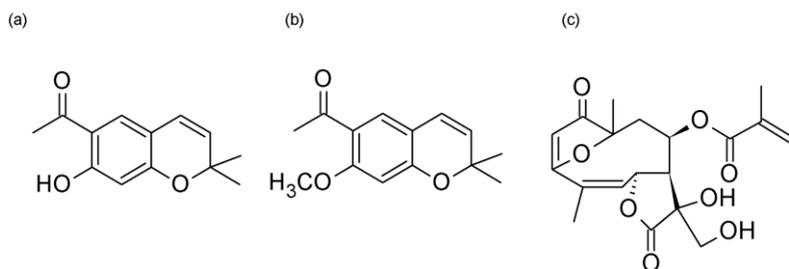
N: número.

**Figura 6.** Estrutura química dos compostos isolados de *Calea uniflora*.

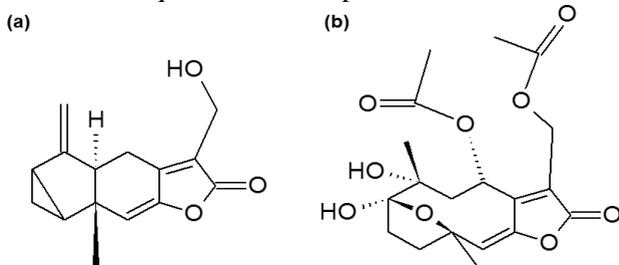


(a) AA01. (b) CH01. (c) CR01. (d) LS01. (e) LS02. (f) LS03. (g) LS04. Fonte: a autora.

**Figura 7.** Estrutura química dos compostos isolados de *Calea pinnatifida*.



(a) CN01. (b) CN02. (c) LS05. Fonte: a autora.

**Figura 8.** Estrutura química dos compostos LS06 e LS07.

(a) LS06. (b) LS07. Fonte: a autora.

Na tabela 2, estão relacionadas as quantidades de cada composto disponíveis para o estudo. Devido ao fato de serem provenientes de fontes naturais e de, em sua maioria, não serem majoritários nas plantas das quais foram isolados, este é um fator importante no planejamento dos estudos. Todas as metodologias executadas foram otimizadas para utilizar o menor volume possível de composto e, assim, possibilitar a realização do maior número de ensaios com cada um deles. Para os estudos executados durante o doutorado sanduíche, foram disponibilizados os compostos LS01, LS05, LS06 e LS07.

**Tabela 2.** Quantidade de cada composto isolado disponível para execução dos ensaios.

Composto	Quantidade (mg)
AA01	6,6
CH01	6,7
CN01	9,3
CN02	10,7
CR01	1,1
LS01	23,0
LS02	6,0
LS03	1,5
LS04	6,8
LS05	21,0
LS06	11,5
LS07	18,0

## 5.2 CULTIVO DAS CEPAS DE MICOBACTÉRIAS

Para a realização do estudo, foram utilizadas as cepas padrão *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* ATCC 25398 e *M. fortuitum* ATCC 6841, cultivadas em meio sólido Ogawa-Kudoh (Laborclin, Pinhais, Brasil) a 37°C até atingirem a fase *log* de crescimento (21 a 28 dias para *M. tuberculosis* e *M. avium* e 7 a 14 dias para *M. fortuitum*).

Cepas padrão *M. tuberculosis* H37Rv também foram cultivadas em meio de cultura líquido 7H9 (Difco™, Becton Dickinson UK Ltd, Reino Unido) suplementado com 0,05% de Tween® 80 (Sigma-Aldrich, EUA) e 10% de ADC (albumina bovina fração V 50 g/L, dextrose 20 g/L e catalase 0,04 g/L) (Difco™, Becton Dickinson UK Ltd, Reino Unido). As cepas foram incubadas a 37°C até atingirem a fase exponencial de crescimento (5 a 7 dias) e repiques feitos a cada 5 a 7 dias até, no máximo, a oitava passagem.

## 5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA *IN VITRO*

### 5.3.1 Triagem dos extratos e compostos

Inicialmente, foi realizada uma triagem para a determinação da atividade antimicobacteriana *in vitro*, utilizando-se os extratos e compostos isolados na concentração de 100 µg/mL, frente às cepas padrão de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. fortuitum*. Para isto, foi utilizada a metodologia REMA (do inglês, *Resazurin Microtiter Assay Plate*) (PALOMINO et al., 2002). Resumidamente, em placa de 96 poços de fundo plano, foram adicionados 200 µL de água estéril tipo II aos poços externos. Aos demais poços, foram adicionados 100 µL dos compostos na concentração 200 µg/mL, diluídos em meio líquido 7H9 contendo 0,5% de glicerol (Amresco, EUA) e suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase – Becton Dickinson, EUA). Após, foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana correspondente ao tubo 1 da escala de McFarland diluída na proporção 1:20, utilizando-se o mesmo meio de cultura. Como controle, foram utilizados inóculos tratados com o veículo dos fármacos apenas (DMSO 1% - Sigma-Aldrich, EUA), inóculos tratados com isoniazida (INH) (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de

0,25 µg/mL e poços contendo apenas o meio 7H9, sem adição do inóculo. As placas foram seladas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. Após 7 dias de incubação, foram adicionados 30 µL da solução de resazurina 0,01% (Sigma, EUA). A persistência da cor azul nos orifícios, após 24 horas, corresponde à ausência de crescimento bacteriano, enquanto o desenvolvimento da cor rósea corresponde à multiplicação bacteriana. Os testes foram realizados em triplicatas técnica e biológica.

### **5.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima**

Para os extratos e compostos que apresentaram atividade antimicobacteriana na etapa de triagem, foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC). Foram testadas concentrações entre 100 µg/mL e 1,56 µg/mL em diluições seriadas na proporção 1:2, utilizando-se a metodologia REMA, descrita anteriormente. Como controles, foram utilizados inóculos tratados com o veículo dos compostos (DMSO 1%), inóculos tratados com INH em concentrações entre 4 µg/mL e 0,0315 µg/mL (em diluições seriadas 1:2) e poços contendo apenas o meio 7H9, sem adição do inóculo. A MIC foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano, impedindo a mudança de cor de azul para rosa (PALOMINO et al., 2002). Os testes foram realizados em triplicatas técnica e biológica.

### **5.3.3 Determinação da concentração bactericida mínima**

A concentração bactericida mínima (MBC) foi determinada pelo subcultivo dos inóculos tratados com os compostos em concentrações equivalentes e maiores que suas respectivas MIC, em meio sólido 7H10 (Difco™, Becton Dickinson, EUA) suplementado com 10% de OADC (Becton Dickinson, EUA). Para isto, após a determinação da MIC, o conteúdo bacteriano foi subcultivado em diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ , além do inóculo puro sem diluição. Após incubação de 28 dias a 37°C, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Os testes foram realizados em triplicatas técnica e biológica. A MBC 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).

### 5.3.4 Ensaio de citotoxicidade

Os compostos que apresentaram atividade antimicobacteriana foram testados quanto à citotoxicidade em células de linhagem MRC5, fibroblastos de pulmão de origem humana, utilizando-se o método do MTT (brometo de dimeriazol difeniltetrazólio) (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991). As células foram cultivadas e mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e tampão HEPES 10 mM, pH 7,4 (Gibco™, Life Technologies, Brasil), em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a realização do ensaio, a suspensão celular foi centrifugada a 200 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente (15°C a 25°C). Após descartar o sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspenso em 1,0 mL de meio de cultura. O número de células viáveis foi avaliado utilizando-se Azul de Trypan 0,5% (Vetek, Brasil) e amostras com viabilidade celular superior a 90% foram utilizadas para o ensaio. As células foram adicionadas a placas de 96 poços de fundo plano na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL e tratadas com os compostos por um período de 24 horas. Os compostos LS01, LS04, LS05, LS06 e LS07 foram testados nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL, enquanto CH01, CN02, LS02 e LS03 foram testados nas concentrações 10, 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL. Todas as soluções foram diluídas em meio de cultura. Como controle, foram utilizadas células sem tratamento e células tratadas com o veículo dos compostos (DMSO 1%). Após o período de 24 horas de tratamento, as placas contendo as células foram centrifugadas a 200 x g, o sobrenadante removido e foi adicionado meio de cultura fresco contendo 10% (v/v) de solução de MTT (5 mg/mL, em tampão fosfato salino – PBS). Após 3 horas de incubação a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em solução ácida de isopropanol (isopropanol/HCl 0,04N) e, após nova centrifugação para a remoção dos restos celulares, o sobrenadante foi transferido para outra placa. A viabilidade celular foi avaliada pela conversão do sal de tetrazólio de coloração amarelada a um derivado formazana de cor azulada, por

intermédio da atividade oxidativa das células. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika, Bélgica) em comprimento de onda de 540 nm. A densidade óptica (DO) do grupo controle sem tratamento foi considerada como 100% de células viáveis. A concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) foi calculada a partir da curva concentração-resposta de cada composto, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5. Os resultados obtidos foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM). Os testes foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas.

### 5.3.5 Cálculo do índice de seletividade

A partir dos valores de citotoxicidade e MIC, foi calculado o Índice de Seletividade dos compostos (SI = IC<sub>50</sub>/MIC), valor utilizado para estimar a janela terapêutica de fármacos e identificar candidatos a fármacos para estudos adicionais. Os compostos com maiores valores de SI foram selecionados para seguimento dos estudos.

### 5.3.6 Ensaio da curva de tempo de morte

O ensaio da curva de tempo de morte foi realizado para avaliar a atividade dos compostos selecionados anteriormente frente a *M. tuberculosis*, ao longo do tempo. Suspensões bacterianas provenientes de culturas líquidas de *M. tuberculosis* em fase exponencial de crescimento, com densidade óptica em 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0,218, foram diluídas em meio 7H9 na proporção 1:20. Na sequência, foram tratadas com os compostos em concentrações entre 100 µg/mL e 1,56 µg/mL, em diluições seriadas na proporção 1:2, em triplicata. Também foi utilizada INH em concentrações entre 4 µg/mL (8xMIC) e 0,125 µg/mL (0,25xMIC), em diluições seriadas na proporção 1:2. Suspensões bacterianas tratadas somente com o veículo dos fármacos (DMSO 1%) foram utilizadas como controle. As culturas foram incubadas a 37°C por 21 dias.

Para avaliar a atividade dos compostos ao longo do tempo, foram utilizadas duas abordagens. Na primeira, a viabilidade celular foi avaliada a cada 24 horas, durante 7 dias, utilizando-se o teste BacTiter-Glo™ (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Também foram realizadas edições no 14° e no 21° dias. Este ensaio determina a viabilidade celular microbiana utilizando-se ATP como indicador de células metabolicamente ativas. Em resumo, 50 µL do reagente BacTiter-Glo foram adicionados a 50 µL de suspensão bacteriana, em placas de 96 poços opacas de cor branca de fundo chato. A luminescência foi medida utilizando-se o leitor Glo-Max® Explorer Multimode Detection System (Promega, USA), após incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. As médias dos valores de RLU (do inglês, *relative light unit* – unidades relativas de luz) ± EPM foram plotados *versus* o tempo em dias.

Na segunda abordagem, UFC foram quantificadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 de incubação, subcultivando-se 100 µL de suspensão bacteriana tratada em meio 7H10 (Difco™, Becton Dickinson UK Ltd, Reino Unido) suplementado com 10% de OADC (Becton Dickinson UK Ltd, Reino Unido). Para a quantificação, foram utilizadas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ , além do inóculo puro. As placas foram incubadas por 28 dias a 37°C e as médias do log dos valores de UFC/mL ± EPM foram plotadas em gráfico *versus* o tempo em dias.

A análise dos dados foi feita utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5. A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 5.3.7 Avaliação dos compostos frente a isolados clínicos

Os compostos foram testados frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM). No total, foram utilizados 23 isolados clínicos: 10 sensíveis a todos os fármacos de primeira linha do tratamento de TB (rifampicina, INH, etambutol e estreptomicina), 9 resistentes à INH e 4 resistentes à INH e rifampicina (RMP), considerados resistentes a múltiplos fármacos (MDR). Estas amostras fazem parte de projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFSC) e aprovado sob parecer nº 204.297 (CAAE: 01738512.1.0000.0121).

Os isolados foram cultivados em meio sólido Ogawa-Kudoh por 28 dias a 37°C e tiveram a MIC para cada composto determinado utilizando-se a metodologia REMA, descrita nos itens 5.3.1 e 5.3.2, em triplicata. Devido ao fato de o tempo de incubação necessário para a

detecção da atividade metabólica poder variar entre os isolados, foram incluídos três controles de crescimento, contendo inóculo sem tratamento com os compostos. Os controles foram testados após 7, 10 ou 14 dias de incubação, pela adição da resazurina 0,01%. Quando a mudança de coloração de azul para rosa foi observada no controle após o período de 24 horas de incubação, a resazurina foi adicionada aos demais poços da placa. Caso não houvesse mudança na coloração, as placas eram incubadas por um período adicional de 3 ou 7 dias. Assim, dependendo do tempo necessário para observação de atividade metabólica nos tubos controle, os resultados da MIC foram observados após 8, 11 ou 15 dias de incubação (YAJKO et al., 1995). Os resultados obtidos foram analisados com o *software* SPSS® 22. A associação entre as medianas das MIC obtidas para cada grupo de isolados foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney, em um nível de significância de 95%.

### 5.3.8 Ensaio de combinações antimicrobianas

O teste de *checkerboard* foi realizado para avaliar a interação dos compostos com INH ou RMP, principais fármacos utilizados no tratamento de primeira linha da TB. Para isto, foi utilizada a metodologia REDCA (*Resazurin drugs combination microtiter assay*), baseada na metodologia REMA para avaliação de antimicrobianos (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2013).

As placas foram preparadas com 100 µL de diluições seriadas na proporção 1:2 de INH (1,0 - 0,015 µg/mL) ou RMP (15,0 - 0,03 ng/mL) no eixo *x* e dos compostos no eixo *y*. As concentrações dos compostos foram selecionadas de acordo com a respectiva MIC, sendo utilizadas 2 concentrações acima e 6 abaixo da MIC, para permitir a verificação de antagonismo, aditivismo e sinergismo. LS01, LS06 e LS07 foram testadas nas concentrações 25 a 0,095 µg/mL, LS02, LS03 e LS05 nas concentrações 100 a 0,39 µg/mL e LS04 nas concentrações 50 a 0,19 µg/mL. A figura 9 exemplifica o esquema de combinações entre LS01 e INH. Assim como descrito na metodologia REMA, foram adicionados 200 µL de água estéril aos poços externos da placa e, por isso, foi necessário utilizar duas placas para testar as combinações de cada composto. Feitas as combinações, foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana correspondente ao tubo 1 da escala de McFarland e diluída na proporção 1:20. As placas foram seladas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. Após 7 dias de incubação, foram adicionados 30 µL

da solução de resazurina 0,01% . A persistência da cor azul nos orifícios, após 24 horas, corresponde à ausência de crescimento bacteriano, enquanto o desenvolvimento da cor rósea corresponde à presença de bactérias viáveis.

**Figura 9.** Esquema de combinações entre LS01 e isoniazida.

**(a)**

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	2: 1,0	1: 0,095 2: 1,0	1: 0,19 2: 1,0	1: 0,39 2: 1,0	1: 0,78 2: 1,0	1: 1,56 2: 1,0	1: 3,125 2: 1,0	1: 6,25 2: 1,0	1: 12,5 2: 1,0	1: 25,0 2: 1,0	O	
O	2: 0,5	1: 0,095 2: 0,5	1: 0,19 2: 0,5	1: 0,39 2: 0,5	1: 0,78 2: 0,5	1: 1,56 2: 0,5	1: 3,125 2: 0,5	1: 6,25 2: 0,5	1: 12,5 2: 0,5	1: 25,0 2: 0,5	O	
O	2: 0,25	1: 0,095 2: 0,25	1: 0,19 2: 0,25	1: 0,39 2: 0,25	1: 0,78 2: 0,25	1: 1,56 2: 0,25	1: 3,125 2: 0,25	1: 6,25 2: 0,25	1: 12,5 2: 0,25	1: 25,0 2: 0,25	O	
O	2:0,125	1: 0,095 2: 0,125	1: 0,19 2: 0,125	1: 0,39 2: 0,125	1: 0,78 2: 0,125	1: 1,56 2: 0,125	1: 3,125 2: 0,125	1: 6,25 2: 0,125	1: 12,5 2: 0,125	1: 25,0 2: 0,125	O	
O	2:0,0625	1: 0,095 2:0,062	1: 0,19 2:0,062	1: 0,39 2:0,062	1: 0,78 2:0,062	1: 1,56 2:0,062	1: 3,125 2:0,062	1: 6,25 2:0,062	1: 12,5 2:0,062	1: 25,0 2:0,062	O	
O	CP	1: 0,095	1: 0,19	1: 0,39	1: 0,78	1: 1,56	1: 3,125	1: 6,25	1: 12,5	1: 25,0	O	
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	

**(b)**

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	2: 0,25	1: 0,095 2: 0,25	1: 0,19 2: 0,25	1: 0,39 2: 0,25	1: 0,78 2: 0,25	1: 1,56 2: 0,25	1: 3,125 2: 0,25	1: 6,25 2: 0,25	1: 12,5 2: 0,25	1: 25,0 2: 0,25	O
O	2: 0,125	1: 0,095 2: 0,125	1: 0,19 2: 0,125	1: 0,39 2: 0,125	1: 0,78 2: 0,125	1: 1,56 2: 0,125	1: 3,125 2: 0,125	1: 6,25 2: 0,125	1: 12,5 2: 0,125	1: 25,0 2: 0,125	O
O	2:0,0625	1: 0,095 2:0,062	1: 0,19 2:0,062	1: 0,39 2:0,062	1: 0,78 2:0,062	1: 1,56 2:0,062	1: 3,125 2:0,062	1: 6,25 2:0,062	1: 12,5 2:0,062	1: 25,0 2:0,062	O
O	2: 0,03	1: 0,095 2: 0,03	1: 0,19 2: 0,03	1: 0,39 2: 0,03	1: 0,78 2: 0,03	1: 1,56 2: 0,03	1: 3,125 2: 0,03	1: 6,25 2: 0,03	1: 12,5 2: 0,03	1: 25,0 2: 0,03	O
O	2: 0,015	1: 0,095 2:0,015	1: 0,19 2:0,015	1: 0,39 2:0,015	1: 0,78 2:0,015	1: 1,56 2:0,015	1: 3,125 2:0,015	1: 6,25 2:0,015	1: 12,5 2:0,015	1: 25,0 2:0,015	O
O	CP	1: 0,095	1: 0,19	1: 0,39	1: 0,78	1: 1,56	1: 3,125	1: 6,25	1: 12,5	1: 25,0	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Esquema representativo da combinação de LS01 e INH. (a) LS01 (25 – 0,095 µg/mL) + INH (1,0 – 0,0625 µg/mL). (b) LS01 (25 – 0,095 µg/mL) + INH (0,25 – 0,015 µg/mL). As concentrações do composto e do fármaco estão representadas em cada poço. 1: LS01. 2: INH. o: água. CP: controle positivo. Fonte: a autora.

Para avaliar o efeito da combinação dos antimicrobianos, foi calculado o Índice da Concentração Inibitória Fracionária (*Fractional Inhibitory Concentration Index* – FICI):

$$FICI = (MIC_{A+B}/MIC_A) + (MIC_{B+A}/MIC_B),$$

Em que  $MIC_{A+B}$  corresponde à MIC do fármaco A combinado com o composto B,  $MIC_{B+A}$  à MIC do composto B combinado com o fármaco A,  $MIC_A$  e  $MIC_B$  à MIC do fármaco A e do composto B, respectivamente, testados isoladamente. Valores de FICI inferiores a 0,5 indicam sinergismo, entre 0,5 e 4 indicam indiferença e valores superiores a 4 indicam antagonismo entre os fármacos testados em combinação.

### **5.3.9 Avaliação da atividade bactericida frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo**

Para a avaliação da atividade dos compostos frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo, foi utilizado o modelo de Loebel, de acordo com o descrito por Gengenbacher e colaboradores (2010). Este modelo baseia-se na privação de nutrientes para obtenção de bactérias em estado não-replicativo. Culturas de *M. tuberculosis* em meio 7H9 suplementado com ADC 10%, em fase exponencial de crescimento e  $OD_{600}$  entre 0,1 e 0,2, foram centrifugadas a 2500 x g por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS. Ao final, foram diluídas com PBS para uma  $OD_{600} = 0,1$  e tratadas com os compostos em concentrações entre 100  $\mu\text{g/mL}$  e 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , em diluições seriadas na proporção 1:2, em placas de 96 poços. Como controles, foram utilizados inóculos tratados com o veículo dos compostos (DMSO 1%), inóculos tratados com INH 5  $\mu\text{g/mL}$  (10 vezes o valor da MIC), RMP 5  $\mu\text{g/mL}$  (100 vezes o valor da MIC) e poços contendo apenas o meio 7H9, sem adição do inóculo. As placas foram incubadas a 37°C por 7 dias e, na sequência, as bactérias tratadas com os compostos foram semeadas em meio 7H10 suplementado com OADC 10%, em diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , além do inóculo puro sem diluição. Após incubação por 28 dias a 37°C, as UFC foram quantificadas. Os testes foram realizados em triplicata técnica e duplicata biológica.

### 5.3.10 Avaliação da atividade antimicrobacteriana em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*

Considerando-se que, ao serem inalados, os bacilos de *M. tuberculosis* são fagocitados por macrófagos alveolares e são capazes de sobreviver no interior destas células, avaliou-se a capacidade dos compostos de atravessar a membrana celular dos macrófagos e exercer atividade bactericida em *M. tuberculosis* intracelulares. Para isto, foi utilizado o modelo de infecção de células THP-1, de linhagem humana proveniente de leucemia monocítica aguda, conforme descrito por Monahan e colaboradores (2001).

Células THP-1 foram cultivadas e mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e L-glutamina 2 mM (Gibco™, Life Technologies, EUA), em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização do ensaio, as células foram incubadas por um período de 4 dias e, ao atingir a densidade de 1-2 x 10<sup>6</sup> células/mL, foram tratadas com PMA 20 nM (do inglês, *phorbol 12-myristate-13-acetate* – acetato miristato de forbol) (Sigma, EUA). Este tratamento teve como objetivo estimular a diferenciação dos monócitos em macrófagos e subsequente adesão das células ao plástico das placas de fundo plano. Logo após a adição do PMA, as células foram distribuídas em placas de 24 poços de fundo plano, em densidade de 1x10<sup>6</sup> células/poço, em volume de 1 mL. Após incubação por 24 horas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas com 500 µL de PBS, o que permitiu a retirada das células não aderidas. A adesão celular foi verificada em microscópio invertido e as células aderidas foram incubadas em meio RPMI 1640 suplementado (soro bovino fetal 10%, L-glutamina 2 mM) por mais 24 horas.

Para a etapa de infecção, culturas de *M. tuberculosis* em fase exponencial tardia em meio líquido 7H9 (7 a 12 dias) foram centrifugadas a 2.500 x g por 15 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e L-glutamina 2 mM. A suspensão foi homogeneizada passando-a seringa e agulha (0.6mm x 25 mm ou 31G), para desfazer os grumos bacterianos. Na sequência, a suspensão foi adicionada às células THP-1 estimuladas, em uma multiplicidade de infecção (MOI, do inglês *multiplicity of infection*) de 1:1 e incubadas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após um período de infecção de 4 horas, os bacilos que não foram fagocitados foram removidos com o sobrenadante, e a camada celular foi lavada com PBS e tratada com os

compostos diluídos em meio RPMI suplementado, em quintuplicata. Os compostos foram utilizados em concentrações entre 50µg/mL e 6,25 µg/mL, em diluições seriadas na proporção 1:2. As células foram incubadas por 1, 2, 3, 4 e 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Células infectadas tratadas com o veículo dos compostos (DMSO 1%) e INH (2µg/mL a 0,25 µg/mL, em diluições seriadas 1:2) foram utilizadas como controles dos experimentos. O experimento foi realizado em duplicata biológica.

Após o tratamento com os compostos, foram realizados dois procedimentos: avaliação da viabilidade das células THP-1 e contagem das UFC. Visto que o PMA é um agente que apresenta toxicidade para as células e que a infecção por *M. tuberculosis* também causa morte celular, é necessário verificar a toxicidade dos compostos neste modelo de infecção. Como mencionado anteriormente, o tratamento com os compostos foi realizado em quintuplicata. Uma duplicata foi utilizada para avaliar a viabilidade das células THP-1 e, a partir da triplicata, foi realizada a quantificação de UFC.

Para avaliação da viabilidade celular, utilizou-se o reagente CellTiter-Blue® (Promega, EUA), que baseia-se na capacidade de células metabolicamente ativas de reduzir o corante azul resazurina em resofurina, um produto fluorescente rosa. Após lavagem das células infectadas com 500 µL de PBS, adicionou-se às células provenientes da duplicata 500 µL de RPMI suplementado e 50 µL do reagente CellTiter-Blue (concentração final de 10%). A reação foi incubada por 3 horas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e o sinal fluorescente foi quantificado utilizando-se o leitor Glo-Max® Explorer Multimode Detection System.

As células provenientes da triplicata foram lavadas com 500 µL de PBS, para retirada de restos celulares e bactérias extracelulares. Na sequência, foram rompidas utilizando-se 500 µL de SDS 0,25% (do inglês, *sodium dodecyl sulfate* – dodecil sulfato de sódio) e seringa e agulha (0.6mm x 25 mm), para auxiliar o rompimento dos grumos bacterianos. A suspensão foi diluída em PBS 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> vezes e semeadas em meio 7H10 suplementado com OADC. As placas foram incubadas a 37°C por 28 dias e, após esse período, foi realizada a quantificação de UFC.

### 5.3.11 Avaliação da atividade antimicobacteriana em estrutura *granuloma-like*

Os compostos também foram testados em estrutura *granuloma-like*, que tem como objetivo simular a principal estrutura formada quando ocorre a infecção por *M. tuberculosis*. Para a obtenção das células, foram coletados 10 mL de sangue de dois doadores saudáveis em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético). Os eritrócitos foram lisados utilizando-se solução tampão de cloreto de amônio 0,8%, em proporção 1:2, durante 10 minutos, com homogeneização constante. Após centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos, o sedimento contendo os leucócitos foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após contagem em câmara de Neubauer, as células em concentração  $6,0 \times 10^5$ /mL foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo agarose 1% dissolvida em meio RPMI. Após a distribuição, as células foram infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv em solução contendo  $6,0 \times 10^6$  bactérias/mL (MOI = 10). As placas foram incubadas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por três dias, para a formação do granuloma. No quarto dia, foram adicionados os compostos na concentração 20µM e 100µM, em triplicata. Como controle, foram utilizados poços contendo INH 100µM, DMSO 1% (veículo do composto), poços sem tratamento e poços sem infecção. Após incubação por 24 horas, o sobrenadante foi retirado e as células do granuloma foram lisadas com solução de saponina 1%. O lisado foi submetido a diluições seriadas em base 10 e semeado em meio 7H10 suplementado com 10% de OADC. Após 21 dias de incubação a 37°C, foi realizada a contagem de UFC/mL. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5. Para a análise estatística, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5.4 ESTUDOS *IN SILICO*

### 5.4.1 Perfil físico-químico dos compostos isolados

Com o intuito de estimar a solubilidade e a permeabilidade dos compostos isolados que apresentaram atividade antimicobacteriana, foram utilizados modelos computacionais que calculam alguns parâmetros físico-químicos das moléculas, como proposto por Lipinski e colaboradores (2000; 2001; 2004). O objetivo desta estimativa foi identificar se os compostos em questão obedecem a Regra dos Cinco de Lipinski, capaz de prever moléculas com baixa absorção e permeabilidade quando essas apresentam mais de 5 doadores de ligação hidrogênio, acima de 10 aceptores de ligação hidrogênio, peso molecular superior a 500 e valores de log P (ClogP) acima de 5 (ou MlogP > 4,15). Os valores do peso molecular (PM), milog P, aceptores de ligação hidrogênio (AH) (N + O), doadores de ligação hidrogênio (DH) (NH + OH), número de ligações rotacionáveis, área de superfície polar, percentual de absorção e o número de violações foram obtidos a partir do programa Free Molinspiration, disponível *online* através do JME Editor, cortesia de Peter Ertl da Novartis, disponível no site: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Para fins de comparação, também foram analisados os fármacos RMP e INH, utilizados no tratamento de primeira linha da TB, e artemisinina, LS utilizada no tratamento da malária.

### 5.4.2 Perfil farmacocinético

Propriedades inapropriadas de ADMET, que se referem aos processos farmacocinéticos de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M), excreção (E) e toxicidade (T), têm sido identificadas como as principais causas do insucesso de candidatos a fármacos em estágios avançados de desenvolvimento clínico. As ferramentas modernas de modelagem *in silico* de propriedades farmacocinéticas estão integradas ao processo de planejamento de fármacos, sendo de extremo valor na identificação, seleção e otimização de novas entidades químicas candidatas a fármacos. Para a predição teórica das propriedades farmacocinéticas das moléculas, foi utilizado o programa

ACD/Percepta 2012 (Lodz, Polônia), cortesia de Leandro Latorre da Advanced Chemistry Development Inc., disponível em <http://www.acdlabs.com/resources/ilab/>. Foram avaliados os seguintes descritores biológicos: permeabilidade celular (modelo células Caco-2), percentual de ligação a proteínas plasmáticas, percentual de penetração na barreira hematoencefálica, percentual de absorção intestinal, estabilidade metabólica e toxicidade. O percentual de absorção (%ABS) foi calculado a partir da área de superfície de acordo com a equação:  $\%ABS = 109 - [0.345 \times ASP]$  (AHSAN et al., 2011). Para fins de comparação, também foram analisados os fármacos RMP, INH e artemisinina.

### 5.4.3 Alinhamento das moléculas

Com o objetivo de explorar as características em comum entre os compostos e que possam ser importantes para sua ligação ao sítio ativo, as moléculas foram analisadas quanto às suas características espaciais e de ligação, além de serem alinhadas. Para isto, as moléculas, salvas em formato .mol2, tiveram sua energia minimizada, utilizando-se o *software* Discovery Studio Viewer Pro. Na sequência, as moléculas foram alinhadas no programa *online* PharmaGist (INBAR et al., 2007; SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008, DROR et al., 2009). O alinhamento foi explorado atribuindo-se diferentes pesos para as seguintes características: anéis aromáticos, carga, pontes de hidrogênio e regiões hidrofóbicas. Cada alinhamento recebeu uma pontuação (*score*), dependendo de como a molécula foi alinhada, da quantidade de características que foram alinhadas e do peso de cada característica estipulado para aquele alinhamento. Quanto mais alta a pontuação, melhor é considerado o alinhamento.

### 5.4.4 Cálculo do índice de bioatividade

Como forma de iniciar o estudo do mecanismo de ação, as propriedades moleculares e fatores estruturais de cada um dos compostos foram comparados com seis importantes classes de fármacos (ligantes de receptores acoplados a proteína G, moduladores de canais iônicos, ligantes de receptores nucleares, inibidores de proteases e

outros alvos enzimáticos) através de um *screening* virtual, gerando uma pontuação que foi definida como índice de bioatividade. Quanto maior o valor do índice de bioatividade para determinada classe, maior a chance de esta ser sua atividade biológica. Os dados foram obtidos a partir do programa Free Molinspiration, disponível *online* através do JME Editor, cortesia de Peter Ertl da Novartis, disponível no site: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Para fins de comparação, também foram analisados os fármacos RMP, INH e artemisinina.

## 5.5 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO

### 5.5.1 *Microarrays*

O estudo do mecanismo de ação foi seguido utilizando-se *microarrays* (microarranjos) para avaliar o perfil transcricional de *M. tuberculosis* após o tratamento com os compostos. Inicialmente, parâmetros como concentração dos compostos, tempo de tratamento e volume mínimo de cultura para obtenção da quantidade de RNA necessária, foram avaliados antes da execução desta técnica.

#### 5.5.1.1 Determinação da concentração dos compostos e tempo de tratamento

A escolha da concentração dos compostos utilizados para avaliação da expressão gênica por *microarrays* e o tempo de tratamento são claramente relacionados e variam de acordo com os objetivos de cada estudo: concentrações finais entre 0,1x MIC a 10x MIC e incubações de 20 minutos a 24 horas já foram descritas na literatura. Entretanto, tempos de tratamento entre 4 e 6 horas, utilizando-se os compostos em concentrações de 1-5 x MIC, são considerados bons pontos de partida, visto que pode-se detectar uma resposta transcricional induzida pelos compostos, mas sem as complicações referentes aos efeitos secundários e extensiva morte bacteriana que acompanham altas concentrações e/ou longos períodos de incubação (WADDELL; BUTCHER, 2010).

Como fator inicial, os valores de MIC devem ter sido determinados exatamente no mesmo modelo que será executado o *microarray*. Como esta técnica foi executada durante o doutorado sanduíche, na Inglaterra, e a MIC foi determinada no início do estudo no LBMM/UFSC, a MIC dos compostos foi determinada novamente, desta vez partindo-se de cultura líquida, (1) para verificar se a atividade antimicobacteriana era reprodutível no outro laboratório e (2) porque se utilizou cultura sólida para determinação da MIC no LBMM, enquanto o *microarray* é realizado a partir de cultura líquida. O ensaio foi realizado como descrito nos itens 5.3.1 e 5.3.2, utilizando-se culturas de *M. tuberculosis*, em meio 7H9 suplementado com ADC, em fase exponencial de crescimento, ao invés de *M. tuberculosis* cultivado em meio sólido Ogawa-Kudoh. Após incubação durante 7 dias, a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se os kits BacTiter-Glo™, como descrito no item 5.3.6, e CellTiter-Blue®, como descrito no item 5.3.10.

Definidos os valores de MIC em cultura líquida, partiu-se para a determinação da concentração a ser utilizada para execução dos *microarrays*. A atividade do composto em 24 horas de incubação é um bom indicativo para a escolha da concentração em tempos de tratamento de 4 a 6 horas: havendo indicativos de atividade antimicobacteriana em 24 horas, a mesma concentração pode ser utilizada por 4 a 6 horas para o *microarray*. Baseando-se nos resultados da curva de tempo de morte (item 5.3.6), decidiu-se testar a concentração de 10x MIC. Culturas líquidas de *M. tuberculosis* ( $OD_{600} = 0,307$ ) foram tratadas com os compostos em concentrações correspondentes ao MIC e 10x MIC. Como controles, foram utilizadas culturas tratadas com o veículo dos compostos (DMSO 1%). Após 24 horas de incubação a 37°C, a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o kit BacTiter-Glo™, como descrito no item 5.3.6, e através de quantificação de UFC. As culturas tratadas foram subcultivadas em meio sólido 7H10 suplementado com OADC em diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ . Após 28 dias de incubação, realizou-se a contagem de UFC. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e duplicata biológica.

### 5.5.1.2 Determinação do volume mínimo de amostra para extração de RNA

Para a extração do RNA, foi adotado um protocolo que utiliza tiocianato de guanidina (GTC – do inglês, *guanidine thiocyanate*), de acordo com o descrito por Waddell e Butcher (2010). Como já mencionado, os experimentos executados neste estudo foram otimizados para que a menor quantidade possível de composto fosse utilizada, já que a quantidade disponível era pequena. Esta metodologia de extração de RNA rende, aproximadamente, 50-100 µg de RNA total para cada 50 mL de cultura de *M. tuberculosis* em fase exponencial de crescimento e  $OD_{600} = 0,3-0,5$ . Para a execução do *microarray*, é necessário, no mínimo, 1µg de RNA purificado de cada amostra. Considerando-se que as concentrações de composto utilizadas são altas (10x MIC), a extração de RNA foi testada em volumes de 0,1 mL, 0,5 mL, 1 mL, 2 mL e 10 mL, em duplicata.

As culturas líquidas de *M. tuberculosis* ( $OD_{600} = 0,346$ ), foram adicionados 4 volumes de solução de guanidina 5M (solução GTC - isotiocianato de guanidina 5M, N-lauril sarcosinato de sódio 0,5% , citrato de sódio 25 mM, Tween-80 1%, β-mercaptoetanol 0,1 M – todos Sigma-Aldrich, EUA). As suspensões foram centrifugadas em tubos universais de fundo cônico de 30 mL a 3.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento bacteriano foi ressuscitado em 10 mL de solução GTC. Após centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi removido e 1,2 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados ao sedimento. A suspensão foi adicionada a um tubo de 2 mL contendo 0,5 mL de esferas de sílica de 0,1 mm (Ribolyser, Hybaid, Reino Unido) e as bactérias foram lisadas utilizando-se o agitador FastPrep FP120 (Thermo Savant, França), em velocidade de 6,5 durante 45 segundos. As células rompidas foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Na sequência, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos e incubados à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A fase aquosa foi re-extraída utilizando-se o mesmo volume de clorofórmio e centrifugação de 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Neste ponto, dois protocolos foram testados: para uma das replicatas (amostras 1A, 2A, 3A, 4A e 5A), realizou-se a precipitação dos ácidos nucléicos, com a adição de isopropanol numa quantidade de 0,8 vezes o volume da fase

aquosa e incubação *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A outra replicata (amostras 1B, 2B, 3B, 4B e 5B) foi adicionada diretamente na coluna de purificação.

As amostras da replicata A, depois de incubadas, foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado (Sigma-Aldrich, EUA). Após centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi removido e o volume restante de etanol foi removido por evaporação à temperatura ambiente por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase (Qiagen, Alemanha) e as amostras foram armazenadas em gelo até a etapa de purificação ser iniciada.

O RNA foi purificado utilizando-se o kit RNeasy® Mini Columns (Qiagen, Alemanha) e tratado com DNase I (RNase-free DNase Kit, Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, foram adicionados aos tubos de extração 350  $\mu\text{L}$  de tampão RLT, seguido da adição de 250  $\mu\text{L}$  de etanol. A solução foi aplicada na coluna de purificação e centrifugada a 10.000 rpm por 15 segundos. A coluna foi lavada com 350  $\mu\text{L}$  de tampão RWI, centrifugada a 10.000 rpm por 15 segundos e, após o descarte do tampão, procedeu-se com o tratamento com DNase I, diretamente na coluna. Foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de solução de DNase I (10  $\mu\text{L}$  DNase I + 70  $\mu\text{L}$  tampão RDD, preparados no momento do uso) e as colunas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente para remoção de DNA contaminante. As colunas foram então lavadas com 350  $\mu\text{L}$  de tampão RWI, seguida por duas lavagens com 500  $\mu\text{L}$  de tampão RPE (centrifugações a 10.000 rpm por 15 segundos). Após centrifugação adicional a 13.000 rpm por 1 minuto, para evitar o carreamento de etanol, as colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase foram adicionados diretamente à membrana da coluna. Os tubos com as colunas foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 10.000 rpm por 1 minuto, para eluição do RNA. O RNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando-se o equipamento NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Já a integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese capilar, utilizando-se o kit Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, EUA) e o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

### 5.5.1.3 Extração do RNA

Para a extração do RNA, culturas líquidas de *M. tuberculosis* foram tratadas com os compostos nas concentrações equivalentes a 10x MIC e nos volumes determinados após a análise dos resultados dos protocolos avaliados no item 5.5.1.2, por um período de 4 horas. Como controles, foram utilizadas culturas tratadas com o veículo dos compostos apenas e culturas tratadas com podoandina (POD), uma LS avaliada em estudos anteriores e que não apresentou atividade antimicobacteriana (AMOAHA et al., 2013). O RNA foi extraído de acordo com o descrito no item 5.5.1.2 para as amostras da replicata B, ou seja, sem a etapa de precipitação dos ácidos nucleicos. Após a quantificação e análise da integridade do RNA, as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. O ensaio foi repetido em 3 dias alternados.

### 5.5.1.4 Amplificação do RNA

Como a quantidade de RNA extraída não foi suficiente para a realização dos *microarrays*, foi realizada a amplificação do RNA. Para isto, foi utilizado o kit MessageAmp™ II-Bacteria (Ambion™, Life Technologies, EUA), conforme instruções do fabricante. A reação foi realizada com uma quantidade inicial de 150 ng de RNA total; o volume da solução foi reduzido a 5  $\mu\text{L}$ , utilizando-se um sistema de centrifugação acoplado a uma bomba de vácuo (Concentrator plus, Eppendorf, Alemanha). Na etapa de poliadenilação do RNA, as amostras foram incubadas a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, seguido de incubação em gelo por mais 3 minutos. Após a incubação, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  da Solução de Poliadenilação (contendo 1  $\mu\text{L}$  de 10x Poly-A tailing Buffer, 1  $\mu\text{L}$  de inibidor de RNase, 0,5  $\mu\text{L}$  de Poly-A Tailing ATP, 1  $\mu\text{L}$  de Polymerase Poly-A e 1,5 de água RNase-free) a cada uma das amostras e a reação foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. A transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada adicionando-se 10  $\mu\text{L}$  da Solução de Transcrição Reversa (contendo 1  $\mu\text{L}$  de T7 Oligo(dT) VN Primer, 1  $\mu\text{L}$  de 10x First Stranduffer, 4  $\mu\text{L}$  de dNTP mix, 1  $\mu\text{L}$  de ArrayScript e 3  $\mu\text{L}$  de água RNase-free), seguido de incubação a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Para a síntese da segunda fita de cDNA, foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  da Solução de Síntese

da Segunda Fita (contendo 10  $\mu\text{L}$  de 10x Second Strand Buffer, 4  $\mu\text{L}$  de dNTP *mix*, 2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerase, 1  $\mu\text{L}$  de RNase H e 63  $\mu\text{L}$  de água RNase-*free*) e a reação foi incubada a 16°C por 2 horas. Na sequência, o cDNA foi purificado adicionando-se cDNA Binding Buffer a cada amostra e aplicando-se a solução em colunas de purificação. Após centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto, as colunas foram lavadas com 500  $\mu\text{L}$  de Tampão de Lavagem e centrifugadas novamente a 10.000 x g por 1 minuto. O cDNA foi eluído com 18  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases pré-aquecida a 55°C. As colunas foram incubadas por 2 minutos e centrifugadas a 10.000 x g por 1,5 minutos. Para a amplificação do RNA, foram adicionados 24  $\mu\text{L}$  da Solução IVT (*In Vitro* Transcription – contendo 4  $\mu\text{L}$  de T7 ATP, 4  $\mu\text{L}$  de T7 CTP, 4  $\mu\text{L}$  de T7 GTP, 4  $\mu\text{L}$  de T7 UTP, 4  $\mu\text{L}$  de T7 10x Reaction Buffer e 4  $\mu\text{L}$  de T7 Enzyme mix) e a reação foi incubada a 37°C por 14 horas. O RNA amplificado (aRNA) foi purificado utilizando-se colunas de purificação. Inicialmente, o volume das reações foi completado para 100  $\mu\text{L}$  com água livre de nucleases. Na sequência, foram adicionados aos tubos 350  $\mu\text{L}$  de aRNA Binding Buffer e 250  $\mu\text{L}$  de etanol 100%. As soluções foram adicionadas às colunas de purificação e centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto. As colunas foram lavadas com 650  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem (centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto) e o aRNA foi eluído com 150  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases pré-aquecida a 55°C. As colunas foram incubadas a 55°C por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g por 1,5 minutos. As amostras foram armazenadas a -80°C até o uso.

#### 5.5.1.5 Marcação fluorescente do aRNA

Como o aRNA é correspondente à fita antissenso do RNA extraído, a marcação fluorescente do aRNA foi realizada de forma direta, utilizando-se ULS™ (*Universal Linkage System*) para *microarrays* de uma cor. Para isto, foi utilizado o ULS Fluorescent Labelling Kit for Agilent Arrays (Kreatech Diagnostics, Holanda), com Cy3 (*Cyanine 3*), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, a 2  $\mu\text{g}$  de aRNA, foram adicionados 1  $\mu\text{L}$  de ULS-Cy3, 1,5  $\mu\text{L}$  de 10x Labelling Solution, e água livre de nucleases em quantidade suficiente para 15  $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada a 85°C por 15 minutos, seguida de incubação em gelo por 3 minutos. Após a reação de marcação fluorescente, o aRNA marcado foi purificado para a remoção do fluoróforo (ULS-Cy3) não ligado restante em solução, utilizando-se

as colunas de purificação KREApure, que acompanham o kit. Após aplicação na coluna e centrifugação a 10.000 x g por 2 minutos, a marcação fluorescente do aRNA foi verificada por espectrofotometria em NanoDrop ND-1000, na opção *microarray*.

#### 5.5.1.6 Fragmentação do aRNA

Para a fragmentação do aRNA, foram adicionados 1,5 µL de 10x Fragmentation Buffer (Ambion™, Life Technologies, EUA) e a reação foi incubada a 70°C por 15 minutos. Na sequência, foram adicionados 1,5 µL de Stop Solution (Ambion™, Life Technologies, EUA) e os tubos foram armazenados em gelo até o início da hibridização.

#### 5.5.1.7 Hibridização

Os *arrays* utilizados na etapa de hibridização foram projetados pelo *Bacterial Microarray Group at St. George's (BµG@S)*, sob número de acesso A-BUGS-41 na plataforma online ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) (Agilent Technologies, EUA). Estes *arrays* são compatíveis com a plataforma Agilent 8x15k e contam com a presença de sondas de oligonucleotídeos (60mer), que permitem avaliar a expressão dos 3946 genes de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em cada uma das 8 amostras aplicadas no mesmo *array*.

O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, 11,2 µL de Kreatech Blocking Agent (Kreatech Diagnostics, Holanda) e 22,5 µL de Agilent 2x Hybridisation Buffer (Agilent Technologies, EUA) foram adicionados a 11,3 µL de aRNA-Cy3 fragmentado. Desta solução, 40 µL foram adicionados aos poços das lâminas dos arrays, que foram incubadas a 65°C, com rotação de 20 rpm, durante 16 horas em um forno de hibridização para *microarrays* (Agilent Technologies, EUA). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas com Gene Expression Wash Buffer 1 por 1 minuto, seguida de lavagem com Gene Expression Wash Buffer 2 por 1 minuto a 37°C. Os *arrays* foram escaneados no equipamento Agilent SureScan Microarray Scanner System (Agilent Technologies, EUA), imediatamente após as lavagens.

### 5.5.1.8 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o programa GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies, EUA). As triplicatas foram avaliadas utilizando-se o teste *Principal Component Analysis* (PCA) e os dados foram normalizados em relação ao percentil 50 de todos os genes representados no *array*. A expressão diferencial dos genes foi identificada utilizando-se o Teste-*t* Moderado, seguido da correção de teste múltiplo de Benjamini e Hochberg. Foram considerados diferencialmente expressos os genes com alterações > 2 vezes e que apresentaram valores de  $p < 0,05$ . Com a finalidade de identificar assinaturas transcricionais semelhantes, foi utilizada a análise de probabilidade hipergeométrica, comparando os resultados obtidos com outros previamente publicados.

### 5.5.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa

A fim de validar os resultados obtidos nos *microarrays*, nove genes diferencialmente expressos no *microarray* (superexpressos ou supraexpressos), foram escolhidos de forma aleatória e analisados por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).

Para a síntese do cDNA, foi utilizado o kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit para RT-qPCR (Thermo Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Como molde, foram utilizados 1 µg de aRNA (amplificado no item 5.5.1.4) e cada amostra, que foram inicialmente tratados com DNase. Ao aRNA, foram adicionados 1 µL de 10x dsDNase Buffer, 1 µL de dsDNase (do inglês, *double strand DNase* – DNase para DNA dupla fita) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para 10 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 minutos. Na sequência, foram adicionados aos tubos 4 µL de 5x Reaction Mix, 2 µL de Maxima Enzyme Mix e 4 µL de água livre de nucleases. A reação foi incubada por 10 minutos a 25°C, seguida de incubação a 65°C por 15 minutos, como recomendado para amostras contendo altas concentrações de citosina e guanina. Ao final, a reação foi encerrada por aquecimento a 85°C por 5 minutos, para inativação da transcriptase reversa. Ao controle negativo da reação, não foi adicionado aRNA. Ainda, como controles para verificação de contaminação por DNA

genômico, foram realizadas reações sem a adição da enzima transcriptase reversa para cada uma das amostras de aRNA.

Os iniciadores para a qPCR foram desenhados utilizando-se o programa PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies, EUA), disponível *online* (<http://www.idtdna.com/primerquest>). As sequências de todos os genes foram retiradas da plataforma *online* TubercuList (<http://tuberculist.epfl.ch/>). Os iniciadores desenhados foram verificados quanto à qualidade, utilizando-se o programa *online* OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer> – Integrated DNA Technologies, EUA), e quanto à especificidade por meio da ferramenta *online* PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As sequências dos iniciadores e os genes selecionados podem ser visualizados na tabela 3. Como genes normalizadores, foram utilizados 16S rRNA (RYNDAK et al., 2014) e *pola*.

A qPCR foi realizada utilizando-se o kit QuantiTect® SYBR® Green PCR (Qiagen, Alemanha). As reações foram otimizadas para um volume final de 15 µL, contendo 7,5 µL de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0,3 µM de cada iniciador e cDNA diluído 1:10 em água livre de nucleases. As condições de amplificação foram: 95°C por 15 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A fim de avaliar a especificidade dos produtos formados, foi realizada a curva de dissociação, na qual a temperatura foi elevada gradualmente de 60°C a 95°C, permanecendo por 15 segundos em cada grau. A formação de um pico único foi adotada como critério de garantia da especificidade dos iniciadores. As reações foram realizadas em termociclador 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), em placas de 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, EUA) e seladas com MicroAmp® Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, EUA). Os genes foram avaliados em triplicatas técnicas e biológicas. Como controles negativos, foram utilizados o controle negativo de cDNA e reações sem adição de cDNA. Para a avaliação de contaminação por DNA genômico, também foram incluídos os controles de cDNA sem adição da enzima transcriptase reversa. Os dados foram analisados por meio do *software* ABI 7900HT Sequence Detection System 2.4 (Applied Biosystems, EUA).

**Tabela 3.** Sequência dos iniciadores utilizados na qPCR para validação dos *microarrays*.

GENE	SEQUÊNCIA	PRODUTO (pb)
<i>arsC</i>	F 5'- CAAACCCAGCGTCCTATTTCG - 3'	99
	R 5'- GGACTTCGATGCGGTCAC - 3'	
<i>gltA1</i>	F 5'- AGACCAATTTCGTTGACCTACC - 3'	98
	R 5'- CAACTCACCACGCCACA - 3'	
<i>moeB1</i>	F 5'- CGCCCACGTTATTGTATCTG - 3'	79
	R 5'- TTCGACTCGTCAACCACATC - 3'	
PE15	F 5'- GTTCACGGTAGTCAGCATGT - 3'	106
	R 5'- CATCCCTAGCGGCATAACTG - 3'	
PE31	F 5'- AGGTGTCGCTGCTGCTTG - 3'	100
	R 5'- CGTGGTCACAACTGCTCAT - 3'	
<i>rpfC</i>	F 5'- AGTTGCCAATCGGGTCT - 3'	135
	R 5'- GCCCAAATGATCTCGTTGATG - 3'	
<i>rpoE</i>	F 5'- GGATACTGACCAACACCTACATC - 3'	76
	R 5'- ATCTGCTCGGTTCGGATACTC - 3'	
<i>thiX</i>	F 5'- GATCTGGGAGATGTTGCTCAC - 3'	104
	R 5'- ACATCGAAGATCAACGTGGTG - 3'	
<i>trxA</i>	F 5'- AAGTCCGCCACCATCAAAG - 3'	96
	R 5'- ACACCATGTTCGCCAAA - 3'	
16S rRNA	F 5'- GTGGCGAACGGGTGAGTAAC - 3'	97
	R 5'- ATGCATCCCGTGGTCCTATC - 3'	
<i>polA</i>	F 5'- GAGTTAGCGCGTATCGACTC - 3'	88
	R 5'- TACCGGCACTTCCATCTTC - 3'	

F: iniciador senso; R: iniciador antissenso.

Durante a padronização da reação, os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,5% (80V durante 40 minutos), corados por brometo de etídio (1 µg/mL – Sigma-Aldrich, EUA) e visualizados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (ImageQuant LAS 500, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com marcador de tamanho molecular (*ladder*) de 50pb.

Para avaliar a eficiência dos iniciadores das reações, os dados brutos de fluorescência gerados ao final de cada ciclo de amplificação foram exportados para o Programa LinRegPCR- Analysis of quantitative RT-qPCR Data, versão 2012.3 (RUIJTER et al., 2009). Foram considerados ideais valores de eficiência entre 1,8 e 2,0. A

estabilidade dos genes de referência para aplicação na normalização da qPCR foi avaliada utilizando-se a ferramenta *online* RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference&ckattempt=3>). Já para o cálculo da expressão gênica, foi utilizado o método do C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação) comparativo –  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ , em que  $\Delta\Delta C_q = \Delta C_{q_{\text{composto}}} - \Delta C_{q_{\text{controle}}}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados obtidos foram analisados por meio do *software* SPSS® 22 e a associação entre as variáveis foi avaliada pelo teste *t* de Student, em um nível de significância de 95%.

### 5.5.3 Ensaio para detecção de espécies reativas de oxigênio

Visando verificar os resultados obtidos no *microarray*, foi realizado um ensaio para detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs), utilizando-se o kit ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay (Promega, EUA). O teste baseia-se na detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ERO de maior tempo de meia vida e na qual diversas outras EROs são convertidas. Para isto, um substrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage diretamente com esta molécula e gera um precursor de luciferina. Após a adição de d-cisteína, o precursor é convertido à luciferina, a qual posteriormente reage com a luciferase, emitindo sinal fluorescente proporcional à concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este kit foi desenvolvido para uso em cultura celular e, por isso, os testes foram realizados inicialmente em células de linhagem THP-1. Posteriormente, o kit foi testado em cultura líquida de *M. tuberculosis*, com auxílio da assessoria científica do fabricante.

Para o teste em cultura celular, as células THP-1 foram cultivadas como descrito no item 5.3.10 e distribuídas em placas brancas de 96 poços e fundo chato, em densidade de 10.000 células/poço, em volume de 80µL. Os compostos foram adicionados nas concentrações de 100 µg/mL a 6,25 µg/mL (diluições seriadas em proporção 1:2), diluídos diretamente na solução contendo o substrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e adicionados em volume de 20 µL. Como controles, foram utilizados poços contendo células tratadas com o veículo dos compostos, poços contendo apenas o meio de cultura e poços contendo meio de cultura e os compostos, sem células. Além disso, células tratadas com menadiona 15 µM e 50 µM foram utilizadas como controles positivos da reação. Após incubação de 4 horas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados aos poços 100 µL da solução de detecção (ROS-Glo™ Detection Solution). A luminescência foi medida

utilizando-se o leitor Glo-Max® Explorer Multimode Detection System, após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente.

Para detecção de EROs em *M. tuberculosis*, culturas em meio 7H9 em fase exponencial de crescimento e  $OD_{600} = 0.129$  foram tratadas com os compostos em concentrações de 100 µg/mL a 6,25 µg/mL (diluições seriadas em proporção 1:2), em volume de 80 µL, e incubadas por 18 horas a 37°C. Os mesmos controles utilizados no teste em cultura celular foram utilizados para o teste com *M. tuberculosis* em cultura líquida. Na sequência, foram adicionados 20 µL do substrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, após incubação por 6 horas a 37°C, foram adicionados 100 µL da solução de detecção (ROS-Glo™ Detection Solution). A luminescência foi medida utilizando-se o leitor Glo-Max® Explorer Multimode Detection System, após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente.

A análise dos dados foi feita utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5. A análise estatística foi realizada utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 5.5.4 Seleção de mutantes espontâneos

Com o objetivo de identificar o alvo molecular dos compostos, foi utilizada a estratégia de seleção de mutantes espontâneos resistentes a altas concentrações dos compostos. Para isto, foram utilizadas duas abordagens. A primeira, comumente utilizada, consistiu em semear *M. tuberculosis* em meios de cultura contendo altas concentrações do composto (ANDRIES et al., 2005; MAKAROV et al., 2009). Meios de cultura 7H10 suplementado com 10% OADC e contendo os compostos em concentrações equivalentes a 10x MIC foram preparados em placas de Petri divididas em 4 partes. A cada uma das partes, foram adicionados 100 µL de cultura líquida de *M. tuberculosis* contendo  $1 \times 10^9$  bactérias. Os meios foram incubados a 37°C por 8 semanas. Em caso de crescimento bacteriano, colônias isoladas foram repicadas em meios 7H10 contendo o composto na mesma concentração, para confirmação da resistência.

Como a seleção de mutantes espontâneos utilizando-se a primeira abordagem permitiu a seleção de bactérias resistentes a somente um dos compostos testados, foi utilizada também uma segunda abordagem. Durante os ensaios da curva de tempo de morte (item 5.3.6),

observou-se que: (1) após tratamento de *M. tuberculosis* com LS06 100 µg/mL, não houve crescimento bacteriano em meio 7H10 em todas as replicatas, (2) após tratamento com LS06 50 µg/mL e repique em meio 7H10, houve crescimento de somente 1 ou 2 colônias em algumas replicatas de diferentes dias e (3) após tratamento com LS07 100 µg/mL e repique em meio 7H10, houve crescimento de somente 1 ou 2 colônias em algumas replicatas de diferentes dias. Estas colônias, crescidas em meio sólido mesmo após tratamento com altas concentrações dos compostos em meio líquido, foram então repicadas para meios sólidos 7H10 contendo as mesmas concentrações de composto, para verificação da resistência.

#### 5.5.4.1 Extração do DNA

As colônias que cresceram em meio contendo altas concentrações dos compostos (mutantes espontâneos) e que tiveram sua resistência confirmada tiveram seu DNA extraído utilizando-se o QIAmp® UCP Pathogen Mini Kit with prelysis (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, as suspensões bacterianas, em volume de 500 µL em água livre de nucleases, foram submetidas a temperaturas de 98°C durante 45 minutos, permitindo que o procedimento de extração de DNA pudesse ser realizado fora do laboratório de Nível Biológico 3. Na sequência, as suspensões foram adicionadas a tubos de lise contendo pérolas de vidro e centrifugadas a 14.000 x g por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 500 µL de tampão ATL (contendo reagente DX). As células bacterianas foram lisadas em agitador FastPrep FP120 por duas vezes durante 45s e velocidade 6,5, com intervalo de 5 minutos entre as agitações. Na sequência, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 2 mL, ao qual também foram adicionados 40 µL de proteinase K. Após incubação a 56°C por 10 minutos, foram adicionados 200 µL de tampão APL 2 e as amostras foram incubadas a 70°C por 10 minutos. Ao lisado bacteriano, foram adicionados 300 µL de etanol 100% (Sigma-Aldrich, EUA) e a solução foi aplicada na coluna de purificação. As colunas foram centrifugadas a 6.000 x g por 1 minuto e, após o descarte do filtrado, foram lavadas com 600 µL de tampão APW 1 (centrifugação 6.000 x g por 1 minuto), seguida de lavagem 750 µL de tampão APW 2 (centrifugação 10.000 x g por 3 minutos). As colunas foram colocadas em novos tubos 2 mL e

incubadas a 56°C por 3 minutos, com a tampa aberta para completa secagem da membrana. Para eluição do DNA, foram adicionados 100 µL de tampão AVE diretamente na membrana. As colunas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto. As amostras de DNA extraídas foram armazenadas a 4°C até o uso.

#### 5.5.4.2 Sequenciamento completo do genoma

As amostras foram submetidas ao sequenciamento completo do genoma, visando identificar mutações pontuais responsáveis pela resistência e que pudessem indicar o alvo molecular dos compostos. Para isto, realizou-se sequenciamento de nova geração, utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina, EUA). O procedimento foi realizado no St George's Hospital, Londres.



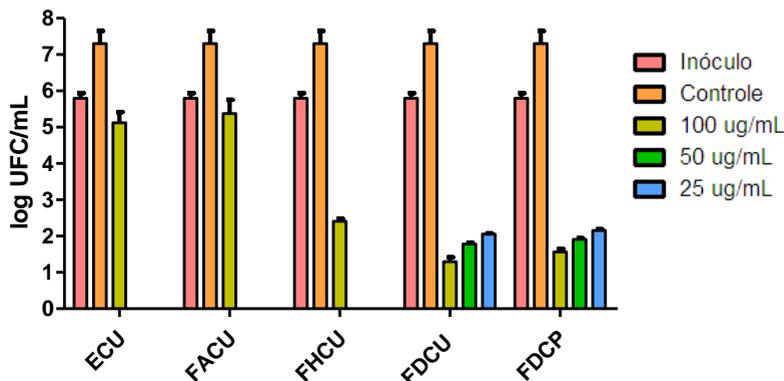
## 6 RESULTADOS

### 6.1 ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA *IN VITRO*

Dentre os extratos obtidos de *C. uniflora*, somente a fração residual aquosa não apresentou atividade antimicobacteriana. O extrato bruto (ECU) e as frações hexânica (FHCU), acetato de etila (FACU) e diclorometano (FDCU) apresentaram atividade frente à cepa *M. tuberculosis* H37Rv, com concentrações inibitórias mínimas (MIC) de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. Já dentre os extratos obtidos de *C. pinnatifida*, somente a fração diclorometano (FDCP) apresentou atividade frente à cepa *M. tuberculosis* H37Rv, com MIC 25 µg/mL. Nenhum dos extratos apresentou atividade frente às cepas padrão *M. avium* ATCC 25398 e *M. fortuitum* ATCC 6841, nas concentrações testadas. Quando os inóculos correspondentes às MIC e concentrações superiores foram subcultivados em meio sólido 7H10, as frações FHCU, FDCU e FDCP apresentaram concentração inibitória mínima (MBC) correspondente à MIC: 100 µg/mL, 25 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. Ou seja, em concentrações correspondentes às suas MIC, estes extratos foram capazes de matar, no mínimo, 99,9% das bactérias presentes no inóculo bacteriano. Na figura 10, isto pode ser visualizado pela redução de pelo menos 3 log em relação ao inóculo, o que indica atividade bactericida. Já o ECU e a fração FACU apresentaram contagens de UFC semelhantes às do inóculo, o que sugere atividade bacteriostática.

Os valores de MIC, IC<sub>50</sub> e índice de seletividade (SI) para os compostos isolados de *C. uniflora* e *C. pinnatifida* estão relacionados na tabela 4. Pode-se verificar que, nas concentrações testadas, nenhum composto apresentou atividade frente às cepas *M. avium* ATCC 25398 e *M. fortuitum* ATCC 6841. Já frente a *M. tuberculosis* H37Rv, todas as lactonas sesquiterpênicas (LS) isoladas de *C. uniflora* (LS01 a 04) e *C. pinnatifida* (LS05) apresentaram atividade. Ainda, os compostos CH01 e CN02 foram ativos, porém somente na concentração de 100 µg/mL. A MIC obtida para isoniazida (INH) foi de 0,5 µg/mL.

**Figura 10.** Avaliação da atividade bactericida dos extratos e frações de *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida*.



Quantificação de UFC após tratamento de *M. tuberculosis* com extratos e frações de *C. uniflora* e *C. pinnatifida* durante 7 dias. ECU, FACU e FHCU não foram testados nas concentrações 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , pois seus respectivos MIC são superiores a essas concentrações. Inóculo: bactérias sem tratamento no dia 0. Controle: inóculo tratado com o veículo dos extratos (DMSO 1%); ECU: extrato bruto de *C. uniflora*; FACU: fração acetato de etila de *C. uniflora*; FHCU: fração hexano de *C. uniflora*; FDCU: fração diclorometano de *C. uniflora*; FDCP: fração diclorometano de *C. pinnatifida*. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: a autora.

Baseando-se nos resultados de MIC e SI obtidos nesta etapa de triagem, optou-se por dar seguimento nos estudos com os compostos pertencentes à classe das LS. Por isso, os compostos LS06 e LS07, isolados previamente no laboratório e pertencentes à mesma classe química, foram adicionados ao estudo.

Quando o MIC das LS foi testado novamente em cultura líquida de *M. tuberculosis*, durante o doutorado sanduíche, LS01, LS05, LS06 e LS07 apresentam MIC de 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Na figura 11, encontram-se os gráficos representativos da viabilidade celular bacteriana após leituras de luminescência e fluorescência, utilizando-se os kits BacTiter-Glo™ e CellTiter-Blue®, respectivamente. Pode-se observar que as curvas obtidas com ambos os kits, para cada composto, são muito semelhantes entre si.

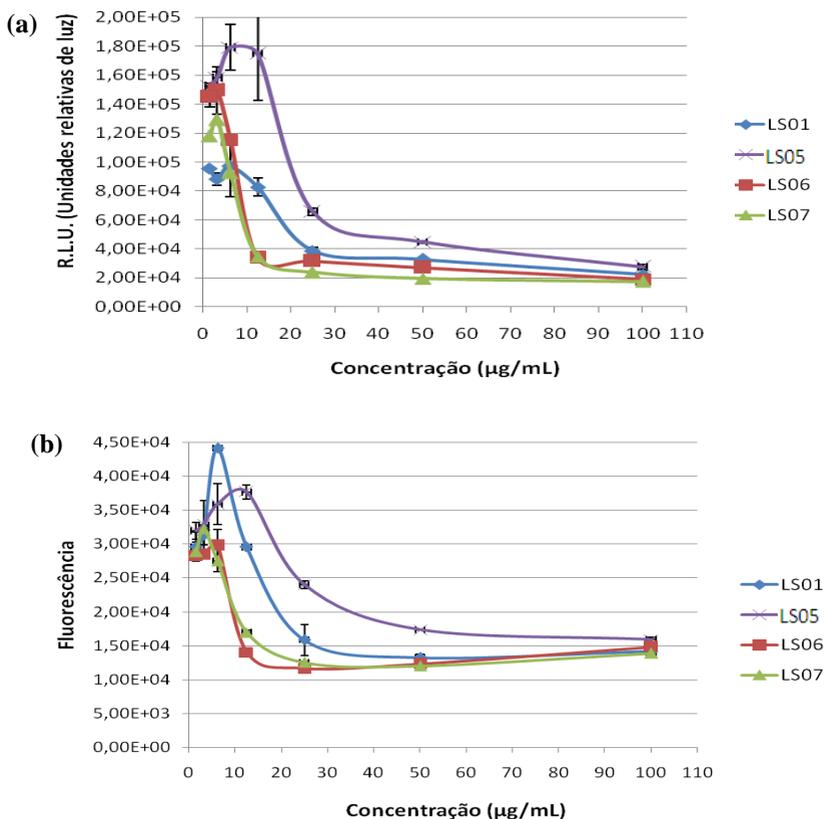
**Tabela 4.** MIC, IC<sub>50</sub> e índice de seletividade para os compostos isolados de *Calea uniflora* e *Calea pinnatifida*.

COMP	MIC µg/mL	MIC	MIC	IC <sub>50</sub> µg/mL	SI
	(µM)	µg/mL	µg/mL		
	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.avium</i>	<i>M.fortuitum</i>	(µM)	
<b>AA01</b>	>100	>100	>100	-	-
<b>CH01</b>	100 (347,22)	>100	>100	202,8 ± 10,72 (704,17 ± 37,22)	2,02
<b>CN01</b>	>100	>100	>100	-	-
<b>CN02</b>	100 (431,03)	>100	>100	95,34 ± 5,67 (410,95 ± 24,44)	0,95
<b>CR01</b>	>100	>100	>100	-	-
<b>LS01</b>	6,25 (17,26)	>100	>100	74,22 ± 4,93 (205,03 ± 13,62)	11,88
<b>LS02</b>	25 (63,13)	>100	>100	125,3 ± 6,36 (316,41 ± 16,06)	5,01
<b>LS03</b>	25 (66,14)	>100	>100	96,42 ± 5,52 (255,08 ± 14,60)	3,86
<b>LS04</b>	12,5 (40,85)	>100	>100	22,18 ± 0,50 (72,48 ± 1,63)	1,77
<b>LS05</b>	25 (67,20)	>100	>100	54,76 ± 3,44 (147,20 ± 9,24)	2,19
<b>LS06</b>	6,25 (25,58)	>100	>100	42,18 ± 1,54 (172,66 ± 6,30)	6,75
<b>LS07</b>	6,25 (15,78)	>100	>100	23,64 ± 0,72 (59,70 ± 1,82)	3,78

Comp: composto. MIC: concentração inibitória mínima. IC<sub>50</sub>: concentração inibitória 50% em células MRC5. SI: índice de seletividade: IC<sub>50</sub>/MIC.

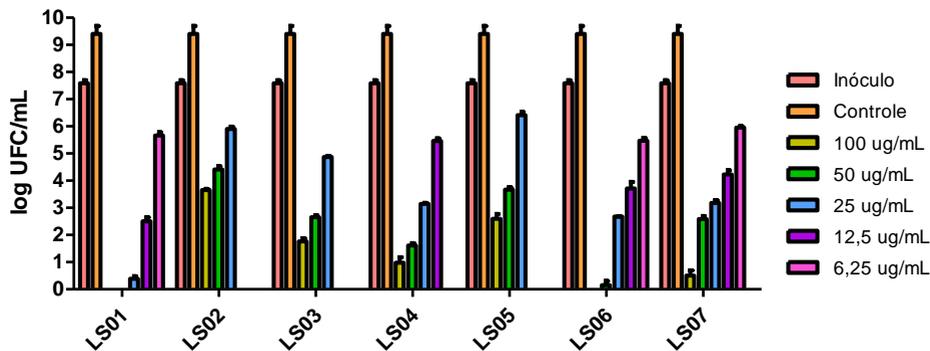
As LS apresentaram atividade bactericida frente a *M. tuberculosis*, após 7 dias de tratamento. Quando o inóculo referente à MIC e concentrações superiores a ele foram subcultivados em meio sólido 7H10, os compostos apresentaram MBC correspondentes a 2xMIC. Ou seja, em concentrações 2xMIC, as LS foram capazes de reduzir a quantidade de bactérias presentes no inóculo em, no mínimo, 99,9%. Na figura 12, isto pode ser visualizado pela redução de pelo menos 3 log em relação ao inóculo.

**Figura 11.** Determinação da viabilidade celular bacteriana após tratamento com os compostos LS01, LS05, LS06 e LS07.



Curvas representando a viabilidade celular bacteriana após 7 dias de tratamento com LS01, LS05, LS06 e LS07, em medidas de (a) luminescência, utilizando-se o kit BacTiter-Glo™ e (b) fluorescência, utilizando-se o kit CellTiter-Blue®. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de experimento representativo da triplicata biológica. Fonte: a autora.

**Figura 12.** Atividade bactericida dos compostos LS01-LS07.

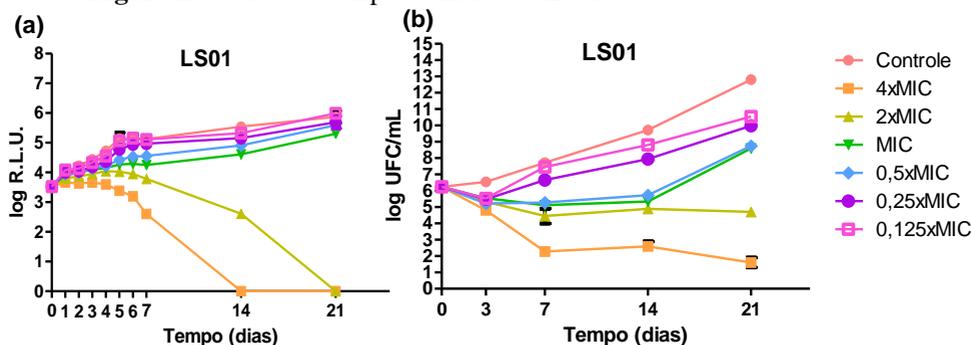


Quantificação de UFC em meio 7H10, após tratamento de *M. tuberculosis* com os compostos LS01 - LS07 durante 7 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da triplicata biológica. Inóculo: bactérias sem tratamento no dia 0. Controle: inóculo tratado com o veículo dos extratos (DMSO 1%). Valores de UFC/mL para LS01 e LS06 100  $\mu\text{g/mL}$ : 0. Valor de UFC/mL para LS01 50  $\mu\text{g/mL}$ : 1. LS02, LS03 e LS05 não foram testados nas concentrações 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , e LS04 não foi testado na concentração 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , pois suas respectivas MIC são superiores a essas concentrações. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: a autora.

Os compostos LS01, LS05, LS06 e LS07 apresentaram atividade antimicrobacteriana tempo e dose dependente ( $p < 0,0001$  para todos os compostos), como pode ser visualizado nas curvas de tempo de morte das figuras 13, 14, 15 e 16, respectivamente. A curva de tempo de morte da INH pode ser visualizada na figura 17. Considerando-se a parte (b) das figuras citadas, pode-se observar que LS06 reduziu a carga bacteriana a zero em 3, 7 e 14 dias quando em concentrações 8xMIC, 4xMIC e 2xMIC (esta última correspondente à MBC), respectivamente. Já na concentração correspondente à MIC, o composto apresentou atividade bacteriostática até o 14º dia, a partir do qual a carga bacteriana começou a se elevar. LS07 apresentou comportamento semelhante à LS06, entretanto foi capaz de reduzir a carga bacteriana a zero somente na concentração 8xMIC após 21 dias. Já na concentração correspondente à MBC (2xMIC), a carga bacteriana começou a se elevar após o 14º dia, de forma semelhante ao que ocorreu em todas as concentrações de INH testadas, indicando resistência ao composto. LS05, composto com maior MIC, apresentou a menor redução da carga

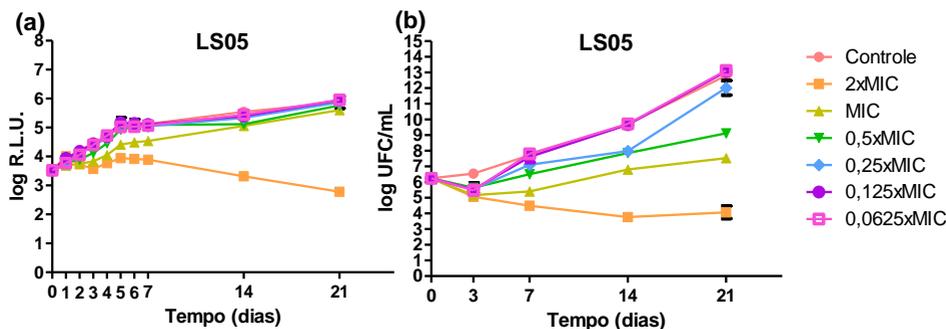
bacteriana quando utilizado em concentração correspondente à MBC (2xMIC), enquanto o MIC também apresentou atividade bacteriostática durante os 21 dias do experimento. Este composto não foi testado em concentrações superiores a 2xMIC, pois a concentração de DMSO seria superior a 1%. Até então, todos os compostos apresentaram resultados compatíveis com a MBC: atividade bactericida em concentrações iguais e superiores a 2xMIC e atividade bacteriostática em concentrações correspondentes ao MIC. Entretanto, isto não foi observado para LS01: em concentração 4xMIC, o composto levou a uma redução significativa da carga bacteriana; já na concentração correspondente à MBC (2xMIC), houve apenas uma pequena redução. A MIC, assim como nas outras LS, apresentou atividade bacteriostática até o 14º dia, a partir do qual a carga bacteriana começou a se elevar. Pode-se observar que houve discrepância entre os resultados de MBC e curva de tempo de morte para este composto: enquanto a MBC indicou que LS01 era o composto com maior atividade bactericida, a mesma potência na atividade não foi demonstrada na curva de tempo de morte. Entretanto, estes ensaios não foram realizados no mesmo laboratório: enquanto a MBC foi determinada durante o início do doutorado, no LBMM/UFSC, a curva de tempo de morte foi realizada durante o doutorado sanduíche, cerca de dois anos depois. Considerando-se que os ensaios foram realizados em replicatas técnicas e biológicas (e portanto tiveram seus resultados confirmados) e que o composto foi transportado por cerca de 10 dias à temperatura ambiente antes da realização da curva de tempo de morte, é possível que este tenha sofrido degradação durante o trajeto.

**Figura 13.** Curva de tempo de morte de LS01.



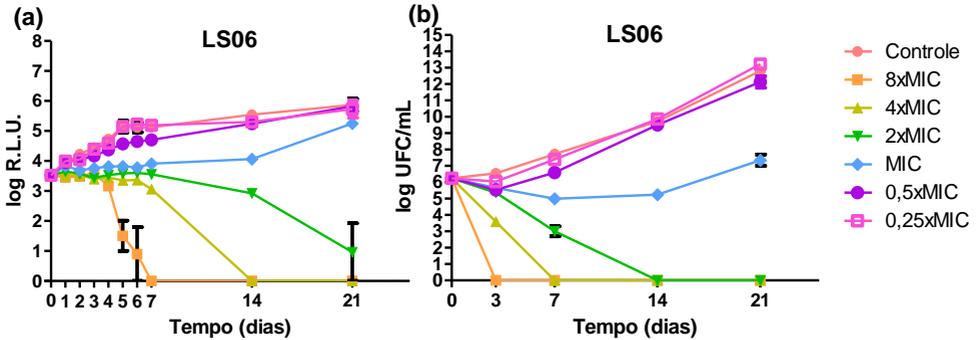
Acompanhamento da viabilidade celular bacteriana ao longo do tempo, após tratamento com LS01, (a) pela medida de luminescência, utilizando-se o kit BacTiter-Glo™, e (b) pela quantificação de UFC/mL após subcultivo em meio 7H10. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. RLU: do inglês, *relative light unit* – unidades relativas de luz. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: autora.

**Figura 14.** Curva de tempo de morte de LS05.



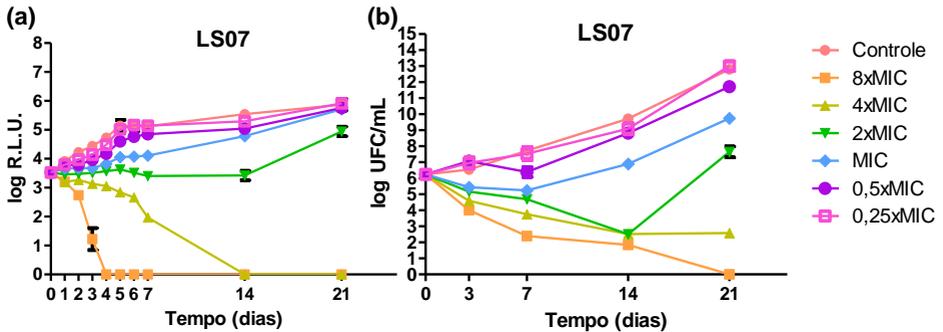
Acompanhamento da viabilidade celular bacteriana ao longo do tempo, após tratamento com LS05, (a) pela medida de luminescência, utilizando-se o kit BacTiter-Glo™, e (b) pela quantificação de UFC/mL após subcultivo em meio 7H10. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. RLU: do inglês, *relative light unit* – unidades relativas de luz. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: a autora.

**Figura 15.** Curva de tempo de morte de LS06.



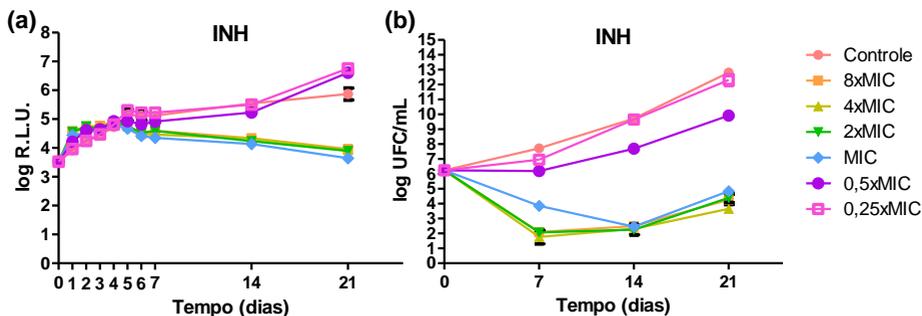
Acompanhamento da viabilidade celular bacteriana ao longo do tempo, após tratamento com LS06, (a) pela medida de luminescência, utilizando-se o kit BacTiter-Glo™, e (b) pela quantificação de UFC/mL após subcultivo em meio 7H10. Cada ponto representa a média ± EPM de experimento representativo da duplicata biológica. RLU: do inglês, *relative light unit* – unidades relativas de luz. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: a autora.

**Figura 16.** Curva de tempo de morte de LS07.



Acompanhamento da viabilidade celular bacteriana ao longo do tempo, após tratamento com LS07, (a) pela medida de luminescência, utilizando-se o kit BacTiter-Glo™, e (b) pela quantificação de UFC/mL após subcultivo em meio 7H10. Cada ponto representa a média ± EPM de experimento representativo da duplicata biológica. RLU: do inglês, *relative light unit* – unidades relativas de luz. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: a autora.

**Figura 17.** Curva de tempo de morte de isoniazida.



Acompanhamento da viabilidade celular bacteriana ao longo do tempo, após tratamento com INH, (a) pela medida de luminescência, utilizando-se o kit BacTiter-Glo™, e (b) pela quantificação de UFC/mL após subcultivo em meio 7H10. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. INH: isoniazida. RLU: do inglês, *relative light unit* – unidades relativas de luz. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: a autora.

Considerando-se a parte (a) das figuras 13, 14, 15, 16 e 17, pode-se observar que a medida da luminescência, utilizado-se o kit BacTiter-Glo™, não foi suficiente para demonstrar a redução da viabilidade celular na fase inicial dos experimentos e nem nas concentrações mais baixas dos compostos. Por exemplo, no terceiro dia de tratamento com LS06, as medidas de luminescência não demonstraram redução na viabilidade celular, enquanto a contagem de UFC mostrou que a carga bacteriana chegou a zero. Já quando o inóculo foi tratado com 2xMIC, as medidas de luminescência demonstraram redução na viabilidade celular somente no 14º dia, enquanto houve redução real de 3 log na quantificação de UFC no 7º dia. Ainda, observou-se que os resultados obtidos por luminescência para INH não refletem os resultados de quantificação de UFC. Posteriormente, foi confirmado que altas concentrações de INH emitem altas taxas de luminescência (dados não apresentados).

As MIC dos compostos LS01, LS02, LS04, LS06 e LS07, quando testadas frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis*, estão apresentados nas tabelas 5, 6 e 7. Pode-se observar que houve um aumento de 2 a 4 vezes (1 ou 2 diluições) no MIC dos compostos testados em isolados clínicos em relação à MIC obtida com a cepa

padrão *M. tuberculosis* H37Rv. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entres as medianas dos MIC de bactérias sensíveis comparadas às bacterias resistentes à INH e às bactérias resistentes a múltiplos fármacos (MDR) (tabela 8).

**Tabela 5.** MIC dos compostos LS01, LS02, LS03, LS06 e LS07 frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis aos fármacos utilizados no tratamento de primeira linha da tuberculose.

AMOSTRA	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )				
	LS01	LS02	LS04	LS06	LS07
IS01	25	50	25	12,5	25
IS02	100	100	25	25	25
IS03	25	50	12,5	12,5	25
IS04	12,5	50	12,5	6,25	25
IS05	25	50	25	12,5	50
IS06	12,5	25	12,5	6,25	25
IS07	6,25	25	12,5	6,25	25
IS08	12,5	50	12,5	6,25	25
IS09	12,5	50	12,5	6,25	25
IS10	6,25	25	12,5	6,25	12,5
<b>MEDIANA</b>	<b>12,5</b>	<b>50</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>25</b>
<b>MIC H37Rv</b>	<b>6,25</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>

**Tabela 6.** MIC dos compostos LS01, LS02, LS03, LS06 e LS07 frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* monorresistentes à isoniazida.

AMOSTRA	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )				
	LS01	LS02	LS04	LS06	LS07
<b>IR01</b>	25	50	12,5	12,5	25
<b>IR02</b>	100	100	25	25	12,5
<b>IR03</b>	12,5	50	12,5	12,5	12,5
<b>IR04</b>	12,5	50	12,5	6,25	12,5
<b>IR05</b>	25	50	25	12,5	25
<b>IR06</b>	25	50	25	12,5	25
<b>IR07</b>	100	100	50	12,5	50
<b>IR08</b>	6,25	25	12,5	6,25	12,5
<b>IR09</b>	12,5	50	12,5	12,5	25
<b>MEDIANA</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>25</b>
<b>MIC H37Rv</b>	<b>6,25</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>

**Tabela 7.** MIC dos compostos LS01, LS02, LS03, LS06 e LS07 frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplos fármacos.

AMOSTRA	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )				
	LS01	LS02	LS04	LS06	LS07
<b>IM01</b>	12,5	50	12,5	12,5	25
<b>IM02</b>	25	50	25	12,5	12,5
<b>IM03</b>	50	100	25	12,5	25
<b>IM04</b>	12,5	50	12,5	6,25	12,5
<b>MEDIANA</b>	<b>12,5</b>	<b>50</b>	<b>18,75</b>	<b>12,5</b>	<b>18,75</b>
<b>MIC H37Rv</b>	<b>6,25</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>

**Tabela 8.** Medianas das MIC dos compostos LS01, LS02, LS04, LS06 e LS07 frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis, resistentes à isoniazida e resistentes a múltiplos fármacos.

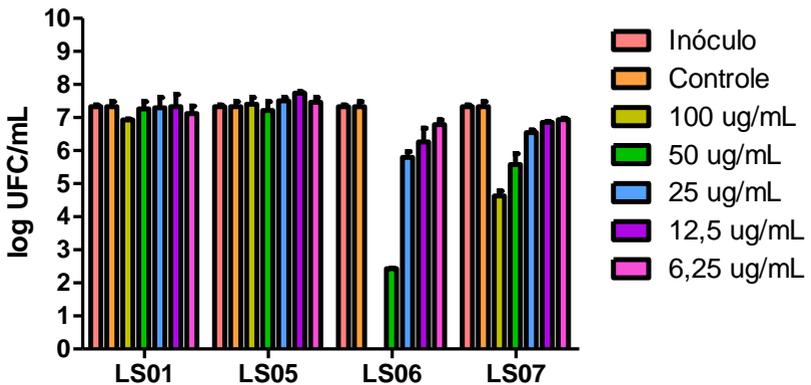
COMPOSTO	MEDIANA MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	Sensíveis	Resistentes INH	<i>p</i>	MDR	<i>p</i>
<b>LS01</b>	12,5	25	0,406	12,5	0,533
<b>LS02</b>	50	50	0,384	50	0,327
<b>LS04</b>	12,5	12,5	0,457	18,75	0,530
<b>LS06</b>	6,25	12,5	0,144	12,5	0,510
<b>LS07</b>	25	25	0,260	18,75	0,283

As medianas dos MIC dos grupos Resistentes à INH e MDR foram comparadas à mediana do grupo Sensíveis, em um nível de significância de 95%, utilizando-se o teste de Mann-Whitney. INH: isoniazida. MDR: resistentes a múltiplos fármacos.

Em combinação com INH, os compostos LS01, LS02, LS03, LS04, LS05, LS06 e LS07 apresentaram valores de FICI 1,5/2,0/2,0/1,5/2,0/1,5/2,0, respectivamente. Já quando combinados com rifampicina (RMP), os valores de FICI foram 2,0/2,0/2,0/1,5/2,0/1,5/2,0. Estes valores, compreendidos entre 0,5 e 4, indicam que há indiferença na combinação entre os compostos e os fármacos, ou seja, não há sinergismo, aditivismo ou antagonismo dos compostos tanto com INH quanto com RMP.

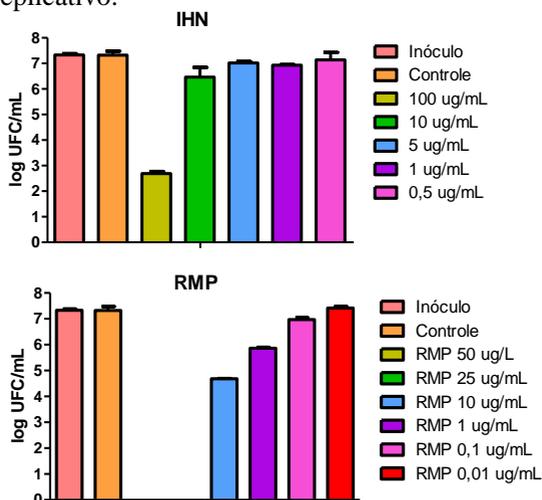
Quando testados frente à *M. tuberculosis* em estado não-replicativo, o composto LS06 apresentou atividade bactericida nas concentrações 100  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto o composto LS07 foi capaz de reduzir mais de 99,9% da carga bacteriana somente na concentração 100  $\mu\text{g/mL}$  (figura 18). Como este ensaio foi realizado durante o doutorado sanduíche, as concentrações correspondem a 8xMIC e 4xMIC. Já os compostos LS01 e LS05 não apresentaram redução da carga bacteriana em nenhuma das concentrações testadas. Neste caso, como as bactérias não estão se multiplicando, não é possível falar em atividade bacteriostática. Na figura 19, é possível observar a atividade de INH e RMP neste mesmo ensaio. INH reduziu a carga bacteriana em mais de 3 log somente na concentração 100  $\mu\text{g/mL}$ , correspondente a 200xMIC, enquanto RMP necessitou de concentrações a partir de 25  $\mu\text{g/mL}$  (25.000xMIC) para reduzir as contagens de UFC de *M. tuberculosis* em estado não-replicativo.

**Figura 18.** Atividade dos compostos LS01, LS02, LS06 e LS07 frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo.



Quantificação de UFC após tratamento de *M. tuberculosis* em estado não replicativo com os compostos LS01, LS05, LS06 e LS07, durante 7 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. Inóculo: bactérias sem tratamento no dia 0. Controle: inóculo tratado com o veículo dos extratos (DMSO 1%). Valores de UFC/mL para LS 06 100  $\mu$ g/mL: zero. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: a autora.

**Figura 19.** Atividade isoniazida e rifampicina frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo.

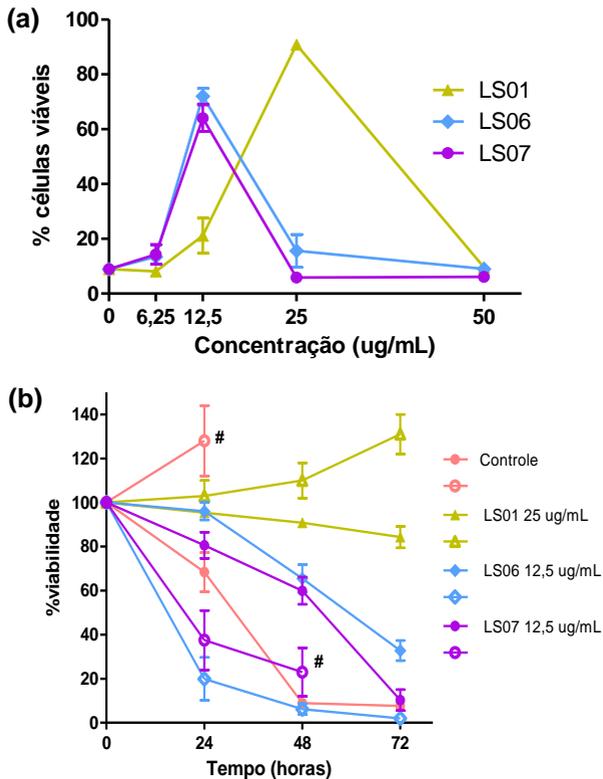


Quantificação de UFC após tratamento de *M. tuberculosis* em estado não replicativo com isoniazida e rifampicina, durante 7 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. Inóculo: bactérias sem tratamento no dia 0. Controle: inóculo tratado com o veículo dos extratos (DMSO 1%). Valores de UFC/mL para RMP 50  $\mu$ g/mL e 25  $\mu$ g/mL: zero. INH: isoniazida. RMP: rifampicina. UFC: unidades formadoras de colônia. Fonte: a autora.

Em modelo de infecção de macrófagos derivados de células de linhagem THP-1, observou-se que os compostos LS01, LS06 e LS07 apresentaram capacidade de proteção das células infectadas somente em concentrações correspondentes à MIC. Na figura 20a, é possível observar que, após 48h de tratamento com os compostos, a viabilidade celular dos macrófagos infectados foi preservada somente com a MIC, enquanto que, em concentrações abaixo e acima deste, a viabilidade foi semelhante à do controle tratado com o veículo dos compostos (DMSO 1%) – em torno de 10%. De forma diferente, a INH apresentou capacidade de proteção às células infectadas em concentrações correspondentes e superiores à sua MIC (0,5  $\mu$ g/mL) (figura 21a). Estes dados indicam que concentrações dos compostos abaixo da MIC podem não ser suficientes para agir em *M. tuberculosis* e proteger os macrófagos infectados, enquanto concentrações superiores à MIC são

citotóxicas e causam morte celular. Deve-se considerar ainda que o PMA, utilizado para estimular a diferenciação celular, e a própria infecção já causam morte celular. Assim, há chances de a citotoxicidade das LS ser maior neste modelo em comparação à cultura celular convencional.

**Figura 20.** Atividade antimicobacteriana dos compostos LS01, LS06 e LS07 em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*.

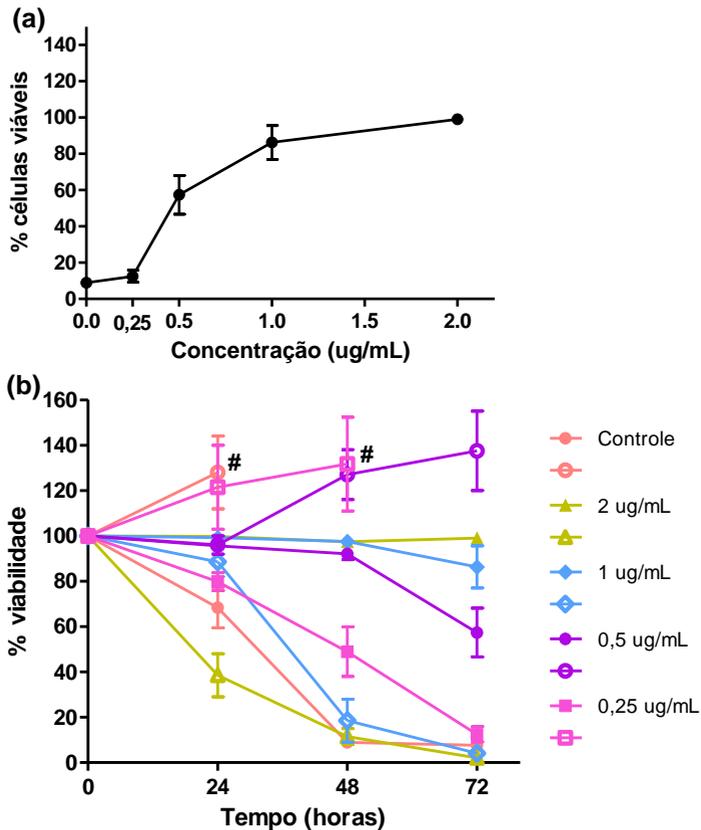


(a) Efeito de LS01, LS06 e LS07 na viabilidade celular de macrófagos derivados de células THP-1 infectados com *M. tuberculosis*, após tratamento por 48 horas. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. (b) Efeitos na viabilidade celular e bacteriana após tratamento de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* com LS01, LS06 e LS07 em concentrações correspondentes à MIC, após 24, 48 e 72 horas. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. Símbolos preenchidos representam viabilidade celular, e símbolos vazios representam viabilidade bacteriana.

enquanto símbolos vazados correspondem à viabilidade bacteriana. # experimento interrompido devido à baixa viabilidade celular. Fonte: a autora.

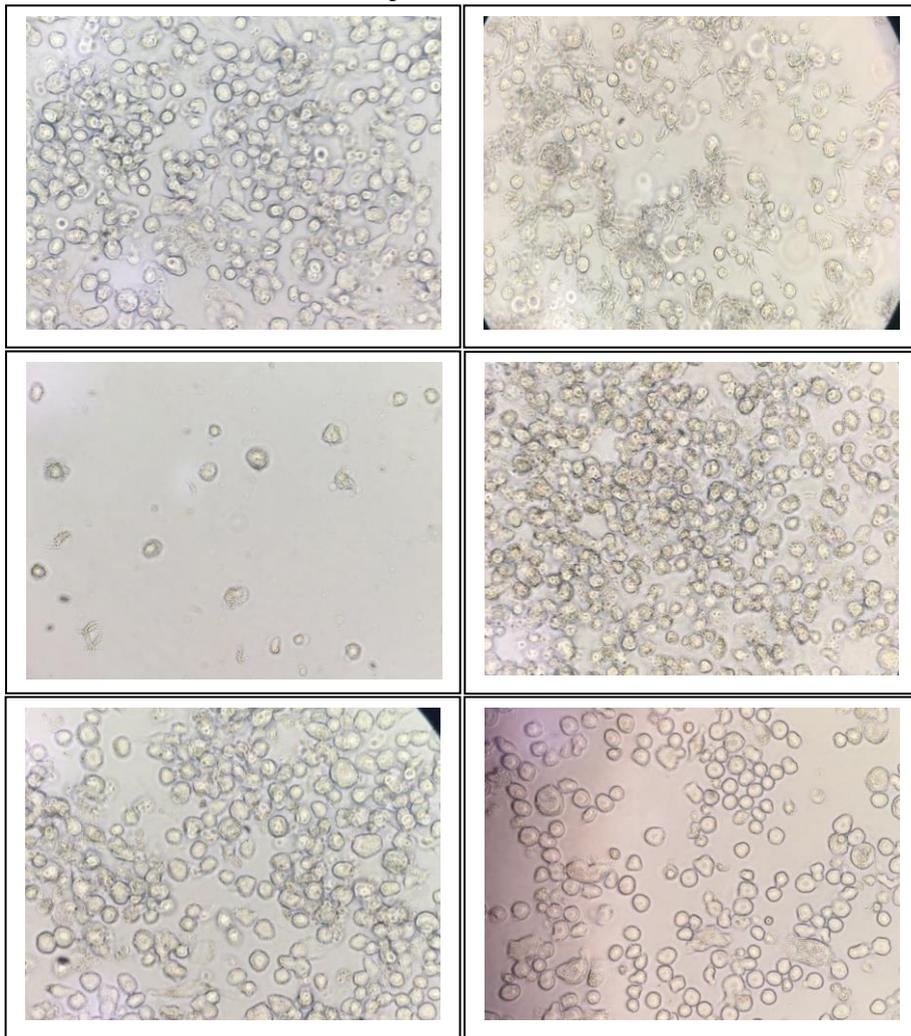
A figura 20b mostra a viabilidade das células infectadas e de *M. tuberculosis* ao longo do tempo, após tratamento com os compostos. Para o controle tratado com o veículo dos compostos, observou-se que houve redução da viabilidade celular logo nas primeiras 24 horas de incubação, combinada com a elevação na contagem de UFC. Após 48 horas, a viabilidade celular reduziu rapidamente, chegando a 8,94%. Deve-se considerar que, previamente ao subcultivo em meio 7H10 para quantificação de UFC, as células não viáveis (e, conseqüentemente, não mais aderidas à placa) e as bactérias extracelulares (devido ao rompimento dos macrófagos) foram removidas com lavagens da camada celular aderida à placa. Assim, a contagem de UFC é correspondente à quantidade de bactérias presentes nas células ainda viáveis e não em todo o conjunto. Por isso, o experimento foi interrompido após 72 horas e a contagem de UFC foi realizada somente quando havia mais de 30% de células viáveis. Nas figuras 22b e 22c, é possível observar um dos poços da amostra controle após 72 horas, antes e após a lavagem da camada celular, respectivamente. Além de haver maior número de células, é possível observar na figura 22b a presença de restos celulares e *M. tuberculosis* extracelular em formação de corda.

**Figura 21.** Atividade antimicobacteriana de isoniazida em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*.



(a) Efeito de INH na viabilidade celular de macrófagos derivados de células THP-1 infectados com *M. tuberculosis*, após tratamento em diferentes concentrações por 72 horas. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. (b) Viabilidade celular e bacteriana após tratamento de macrófagos derivados de células THP-1 infectados com *M. tuberculosis*, após tratamento com INH em concentrações correspondentes a 4xMIC, 2xMIC, MIC e 0,5xMIC, por 24, 48 e 72 horas. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. Símbolos preenchidos representam viabilidade celular, enquanto símbolos vazados correspondem à viabilidade bacteriana. # experimento interrompido devido à baixa viabilidade celular. Fonte: a autora.

**Figura 22.** Viabilidade de macrófagos derivados de células THP-1 infectados com *M. tuberculosis*, após tratamento com LS01 e LS06.



(a) Controle, tratado com o veículo dos compostos (DMSO 1%), logo após a infecção com *M. tuberculosis*. (b) Controle após 72 horas, previamente à lavagem da camada celular. As setas indicam a presença de *M. tuberculosis* em formação de corda. (c) Controle após 72 horas, após a lavagem da camada celular. (d) Células tratadas com LS01 25 µg/mL, após 72 horas de incubação. (e) Células tratadas com LS06 12,5 µg/mL, após 24 horas de incubação. (f)

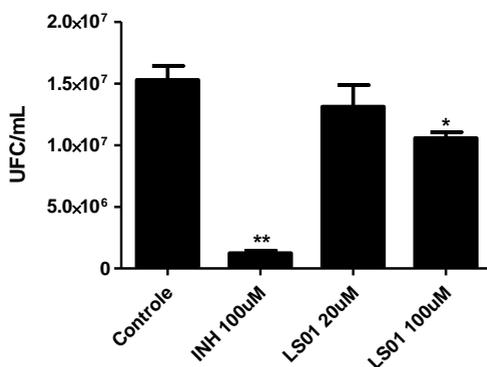
Células tratadas com LS06 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , após 48 horas de incubação. Aumento: 400x. Fonte: a autora.

Ainda na figura 20b, pode-se observar que, em concentração correspondente à MIC, LS01 foi capaz de preservar a viabilidade dos macrófagos infectados ao longo de 72 horas (figura 22d). Entretanto, este composto não foi capaz de reduzir a quantidade de UFC neste período de tempo, observando-se, inclusive, uma elevação no número de colônias ao final do ensaio. De forma diferente, LS06 foi capaz de reduzir a contagem de UFC já nas primeiras 24 horas, além de preservar a viabilidade celular (figura 22e). Após 48 e 72 horas, houve redução gradual na viabilidade celular, entretanto esta ainda foi superior à do controle (figura 22f). Também houve redução da quantidade de UFC neste período, porém deve-se considerar que, como explicado anteriormente, esta contagem refere-se somente às bactérias presentes nas células viáveis. Resultados semelhantes foram obtidos quando as células foram tratadas com LS07, porém com uma maior perda da viabilidade celular. Quando as células foram tratadas com INH, utilizada como controle do modelo, pode-se observar que a viabilidade celular foi preservada durante todo o curso do experimento em concentrações correspondentes a 2xMIC e 4xMIC (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente), juntamente com a redução no número de UFC (figura 21b). Na concentração correspondente à MIC (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), observou-se preservação da viabilidade dos macrófagos nas primeiras 48 horas, sem redução na quantificação de UFC. Após 72 horas de incubação, observou-se aumento na quantidade de UFC e um início de redução da viabilidade celular. Já quando as células infectadas foram tratadas com INH 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0,5xMIC), observou-se redução gradual da viabilidade celular ao longo do tempo, juntamente com elevação de UFC. Salienta-se que a viabilidade bacteriana neste experimento foi reportada como porcentagem, e não como log UFC/mL como nos demais ensaios, pois o tempo de incubação foi somente de 24 a 72 horas.

Quanto à avaliação de atividade dos compostos em estrutura granuloma-like, somente LS01 foi testado. Como neste modelo não é possível estimar a perda de viabilidade celular e a toxicidade dos compostos, LS01 foi escolhido por ser aquele com maior  $\text{IC}_{50}$  e maior índice de seletividade. As concentrações do composto utilizadas neste experimento, 20  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , correspondem a 1,16xMIC e 5,8xMIC, além de 100  $\mu\text{M}$  corresponder a 0,49x  $\text{IC}_{50}$ . Já 100  $\mu\text{M}$  de INH, controle

da reação, corresponde a  $274 \times \text{MIC}$ . Pode-se observar na figura 23 que houve redução estatisticamente significativa no número de UFC/mL quando o granuloma foi tratado com o composto na concentração 100  $\mu\text{M}$ , em relação ao grupo controle tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ). Já o tratamento com INH 100  $\mu\text{M}$  apresentou maior redução no número de UFC/mL, estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e também aos grupos tratados com LS01.

**Figura 23.** Atividade antimicobacteriana do composto LS01 em estrutura granuloma-like.



Efeito do composto LS01, nas concentrações 20  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , na contagem de UFC/mL após tratamento de estrutura granuloma-like por 24 horas, em relação ao controle não tratado e ao tratamento com isoniazida 100  $\mu\text{M}$ . UFC: unidades formadoras de colônia. INH: isoniazida. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (H37Rv),  $p < 0,05$  pelo teste ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. \*\*Diferença estatisticamente significativa em relação a todos os grupos,  $p < 0,05$  pelo teste ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Fonte: a autora.

## 6.2 ESTUDOS *IN SILICO*

Em relação aos parâmetros físico-químicos estimados computacionalmente de acordo com o proposto por Lipinski e colaboradores (2001), nenhum dos compostos testados apresentou violações à Regra dos Cinco de Lipinski (tabela 9). Estes resultados indicam boa biodisponibilidade oral com alta capacidade de absorção e

permeabilidade, o que corrobora a ideia da administração oral destes compostos (LIPINSKI, 2004). Pode-se observar também que a artemisinina, LS utilizada no tratamento da malária, e a INH, fármaco utilizado no tratamento de primeira linha da TB, também não apresentam violações. Já a RMP, também utilizada no tratamento de primeira linha da TB, apresenta 3 violações à Regra dos Cinco de Lipinski.

**Tabela 9.** Parâmetros físico-químicas estruturais dos compostos isolados que apresentaram atividade antimicobacteriana.

<b>Comp</b>	<b>Nat</b>	<b>MlogP</b>	<b>PM</b>	<b>AH</b>	<b>DH</b>	<b>Nr</b>	<b>Vol</b>	<b>ASP</b>	<b>nV</b>
<b>Regra</b>	-	≤ 4,15	<500	≤ 10	≤ 5	<10	-	70-200Å	≤ 1
<b>LS01</b>	26	1,52	362,4	6	2	4	340,3	93,07	0
<b>LS02</b>	27	1,80	378,5	6	2	5	362,8	93,07	0
<b>LS03</b>	27	0,95	378,4	7	2	4	344,4	105,59	0
<b>LS04</b>	23	0,28	322,3	6	2	3	296,3	93,07	0
<b>LS05</b>	27	1,71	376,4	7	2	4	338,1	102,30	0
<b>LS06</b>	18	2,29	244,3	3	1	1	221,8	50,44	0
<b>LS07</b>	28	0,62	396,3	9	2	5	343,7	132,51	0
<b>ART</b>	20	3,32	282,3	5	0	0	258,2	54,01	0
<b>INH</b>	10	-0,969	137,1	4	3	1	122,6	68,01	0
<b>RMP</b>	59	2,62	822,9	16	6	5	755,9	220,16	3

Parâmetros físico químicos preditos pelo programa Free Molinspiration. Nat: número de átomos; MLog P: predição do LogP desenvolvida pelo programa Molinspiration (miLogP2.2 - Novembro, 2005), baseado nas contribuições de diferentes entidades químicas; PM: peso molecular; AH: somatório de N e O aceptores de H; DH: somatório de NH e OH doadores de H; Nr: número de rotações; Vol: vlume; ASP: área de superfície polar; nV: número de violações. ART: artemisinina. INH: isoniazida. RMP: rifampicina.

De acordo com os resultados fornecidos pelo programa ACD/Percept, as LS têm boa solubilidade em água, são quimicamente estáveis em condições ácidas ( $\text{pH} < 2$ ) e apresentam taxas de absorção por via oral (%ABS) acima de 70% (com exceção de LS07, com 63,28%), de modo passivo e por via transcelular, segundo modelo em células Caco-2. Estes valores de absorção, relacionados na tabela 10, encontram-se um pouco abaixo dos valores calculados para artemisinina (90,37%) e acima daqueles obtidos para a RMP (33,05%). Os

compostos também apresentam valores de permeabilidade em células de jejuno humano ( $P_{\text{eff}}$ ) semelhantes entre si e com a artemisinina (com exceção de LS02, que apresenta velocidade reduzida de permeação), além de taxas superiores de permeação em comparação com rifampicina e isoniazida. Os resultados das predições *in silico* também indicam que, ao contrário da RMP, nenhuma das LS atua como substrato da glicoproteína-p, bomba de efluxo que promove de forma ativa a saída de compostos das células. Entretanto, todas as LS, inclusive artemisinina, parecem sofrer significativo metabolismo de primeira passagem (MPP), principal motivo pelo qual sua biodisponibilidade por via oral (BO) predita é inferior a 30%. Além disso, esses compostos apresentam altas taxas de ligação a proteínas plasmáticas (PPP), principalmente à albumina, devido ao seu caráter ácido. Esta característica influencia negativamente na distribuição dos compostos aos tecidos. Enquanto RMP apresenta taxas superiores de PPP, INH apresenta taxas de ligação muito inferiores em relação às LS. Ainda, os resultados indicam que a taxa de penetração das LS pela barreira hematoencefálica é suficiente para atividade no Sistema Nervoso Central (SNC).

**Tabela 10.** Predição das propriedades farmacocinéticas dos compostos LS01-LS07.

Comp	%ABS	$P_{\text{eff}}(\text{cm/s})$	MPP	BO	PPP	SNC	CatTox
<b>Regra</b>	$\geq 70$	-	-	-	-	$\leq -3,5$	-
<b>LS01</b>	76,89	$7,16 \times 10^{-4}$	>50%	<30%	89,65%	-2,6	5 ou NT
<b>LS02</b>	76,89	$1,57 \times 10^{-4}$	>50%	<30%	82,07%	-3,4	4 ou 5
<b>LS03</b>	72,57	$6,47 \times 10^{-4}$	>50%	<30%	58,18%	-2,7	4, 5 ou NT
<b>LS04</b>	76,89	$7,61 \times 10^{-4}$	>50%	<30%	84,97%	-2,3	5 ou NT
<b>LS05</b>	73,71	$5,47 \times 10^{-4}$	>50%	<30%	55,88%	-2,9	3, 4, ou 5
<b>LS06</b>	91,60	$8,53 \times 10^{-4}$	>50%	<30%	69,94%	-2,1	3 ou 4
<b>LS07</b>	63,28	$5,52 \times 10^{-4}$	>50%	<30%	28,65%	-3,0	3 ou 4
<b>ART</b>	90,37	$8,36 \times 10^{-4}$	>50%	<30%	82,15%	-2,3	4 ou 5
<b>INH</b>	85,54	$0,72 \times 10^{-4}$	I	>70%	22,75%	-3,1	4 ou 5
<b>RMP</b>	33,05	$2,8 \times 10^{-4}$	<50%	<30%	90,73%	-5,6	4 ou 5

Propriedades farmacocinéticas preditas pelo programa ACD/Percepta 2012. Comp: composto. %ABS: percentual de absorção;  $P_{\text{eff}}$  (cm/s): permeabilidade em jejuno humano; MPP: metabolismo de primeira passagem. I: insignificante; BO: biodisponibilidade oral; PPP (%): percentual de ligação a proteínas plasmáticas (*in vitro*); SNC: fator de penetração na barreira hematoencefálica (*in vivo*); CatTox: categoria de toxicidade. NT: não tóxico. Cat5: atenção, pode ser perigoso se ingerido –  $2000 \text{ mg/kg} < LD_{50} (\text{dose letal } 50\%) \leq 5000 \text{ mg/kg}$ . Cat 4: atenção, perigoso se ingerido –  $300 \text{ mg/kg} < LD_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$ . Cat 3: perigo, tóxico se ingerido –  $50 \text{ mg/kg} < LD_{50} \leq 300 \text{ mg/kg}$ . ART: artemisinina. INH: isoniazida. RMP: rifampicina.

Em relação à toxicidade, as predições *in silico* indicam que as LS podem pertencer, em sua maioria, às categorias de risco 4 (atenção, perigoso se ingerido –  $300 \text{ mg/kg} < LD_{50}[\text{dose letal } 50\%] \leq 2000 \text{ mg/kg}$ ) ou 5 (atenção, pode ser perigoso se ingerido –  $2000 \text{ mg/kg} < LD_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$ ), assim como artemisinina, rifampicina e isoniazida. Entretanto, há chances de LS01, LS03 e LS04 pertencerem à categoria “não-tóxico”, enquanto LS06 e LS07, aparentemente mais tóxicos, podem pertencer à categoria 3 (perigo, tóxico se ingerido –  $50 \text{ mg/kg} < LD_{50} \leq 300 \text{ mg/kg}$ ).

Os índices de bioatividade fornecidos pelo programa Molinspiration sugerem que as LS podem ser capazes de atuar como inibidores enzimáticos e ligantes de receptores nucleares, com destaque para os compostos LS01, LS03 e LS04, que apresentaram os maiores valores para as duas atividades biológicas (tabela 11).

**Tabela 11.** Índice de bioatividade para as lactonas sesquiterpênicas.

Composto	Ligante RPG	Modulador CI	Inibidor quinase	Ligante RN	Inibidor Protease	Inibidor enzimático
LS01	0,33	0,11	-0,26	0,99	0,04	0,84
LS02	0,30	0,09	-0,23	0,86	0,11	0,72
LS03	0,30	0,16	-0,32	1,03	0,28	0,79
LS04	0,36	0,36	-0,15	1,20	0,26	0,89
LS05	0,23	0,15	-0,31	0,80	0,07	0,42
LS06	-0,41	-0,24	-0,50	0,23	0,05	0,42
LS07	-0,12	-0,13	-0,27	0,22	0,16	0,55
ART	-0,17	-0,31	-0,65	-0,00	-0,19	0,39
INH	-1,51	-1,61	-1,37	-1,29	-2,25	-0,84
RMP	-2,10	-3,27	-3,04	-2,89	-1,61	-2,42

Índice de bioatividade calculado pelo programa Free Molinspiration. RPG, ligantes de receptores acoplados a proteína G; Modulador CI, moduladores de canal iônico; Inibidor quinase, inibidores de quinases; Ligante RN, ligantes de receptores nucleares; Inibidor Protease, inibidores de proteases; Inibidor enzimático, outros inibidores enzimáticos. ART: artemisinina. INH: isoniazida. RMP: rifampicina. As células destacadas correspondem a valores >0. Os tons mais claros correspondem aos valores menores, enquanto os tons mais escuros correspondem a valores maiores. Quanto maior o valor do índice de bioatividade para determinada classe, maior a chance de esta corresponder à atividade biológica do composto.

As características espaciais e de ligação das LS estão relacionadas na tabela 12. Pode-se observar que LS05 e LS07 apresentam regiões hidrofóbicas em menor número, enquanto LS06, que possui o maior número de regiões hidrofóbicas, possui também o menor número de doadores de ligação hidrogênio e aceptores de ligação hidrogênio.

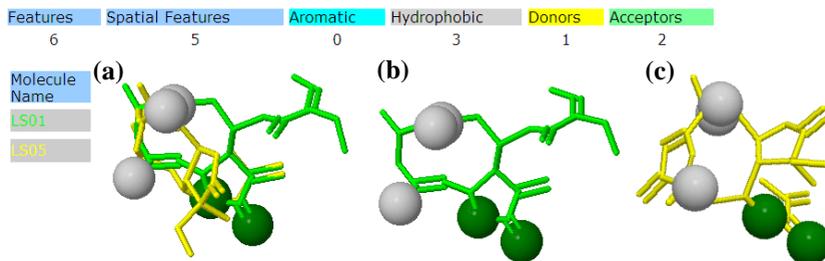
**Tabela 12.** Características espaciais e de ligação de LS01-LS07.

<b>Composto</b>	<b>Átomos</b>	<b>CT</b>	<b>CE</b>	<b>HFB</b>	<b>DH</b>	<b>AH</b>
<b>LS01</b>	54	20	16	10	4	6
<b>LS02</b>	58	23	17	9	6	8
<b>LS03</b>	55	20	16	9	4	7
<b>LS04</b>	45	17	14	9	3	5
<b>LS05</b>	52	18	13	5	5	8
<b>LS06</b>	35	19	17	13	2	3
<b>LS07</b>	55	19	14	4	5	9

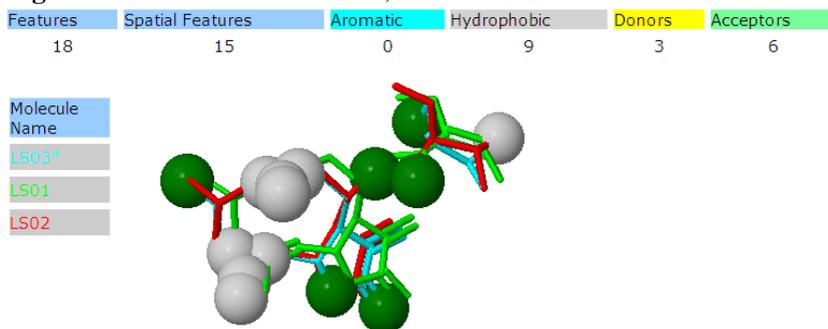
Análise de características espaciais e de ligação fornecida pelo programa PharmaGist. CT: características totais. CE: características espaciais. HFB: regiões hidrofóbicas. DH: doadores de ligação hidrogênio. AH: aceptores de ligação hidrogênio.

Considerando-se que todas as LS estudadas têm o anel lactônico como estrutura em comum, buscou-se fazer o alinhamento destas moléculas com o objetivo de também alinhar esta estrutura. Dentre os diversos resultados de alinhamento obtidos englobando todas as 7 moléculas de LS, nenhum foi capaz de alinhar o anel lactônico de todas. Entretanto, um deles foi capaz de alinhar o anel lactônico de 6 moléculas, com exceção de LS05. No caso das 6 moléculas alinhadas, os oxigênios aceptores de ligação hidrogênio do anel lactônico foram os responsáveis pelo alinhamento. Já LS05 alinhou-se aos oxigênios do anel lactônico das demais moléculas pelos oxigênios do éster alifático. Na figura 24, é possível observar as estruturas espaciais alinhadas entre as 7 moléculas de LS deste estudo: 3 regiões hidrofóbicas (HFB), 1 doador de ligação hidrogênio (DH) e 2 aceptores de ligação hidrogênio (AH). Somente LS01 e LS05 estão representadas para facilitar a observação das estruturas alinhadas. Quando LS05 foi analisada com as outras LS separadamente, o anel lactônico pôde ser alinhado.

Dentre todos os alinhamentos fornecidos pelo programa PharmaGist, a maior pontuação (*score*) foi obtida quando LS01 (MIC = 6,25 µg/mL), LS02 (MIC = 25 µg/mL) e LS03 (MIC = 25 µg/mL) foram alinhadas. Pode-se observar na figura 25 que este alinhamento apresentou 18 características alinhadas, sendo 9 HFB, 3 DH e 6 AH. Entretanto, apesar da alta similaridade entre as moléculas, LS01 tem maior atividade antimicrobacteriana em relação a LS02 e LS03, o que pode indicar que nem todas as características em comum são importantes para a atividade.

**Figura 24.** Alinhamento de LS01 e LS06.

Alinhamento de LS01 e LS05 realizado pelo programa PharmaGist, considerando-se características espaciais e de ligação. (a) LS01 e LS05. (b) LS01 somente. (c) LS05 somente. Features: Características alinhadas. Spatial Features: Características espaciais alinhadas. Aromatic: anéis aromáticos alinhados. Hydrophobic: regiões hidrofóbicas alinhadas. Donors: doadores de ligação hidrogênio alinhados. Acceptors: aceptores de ligação hidrogênio alinhados. Fonte: a autora.

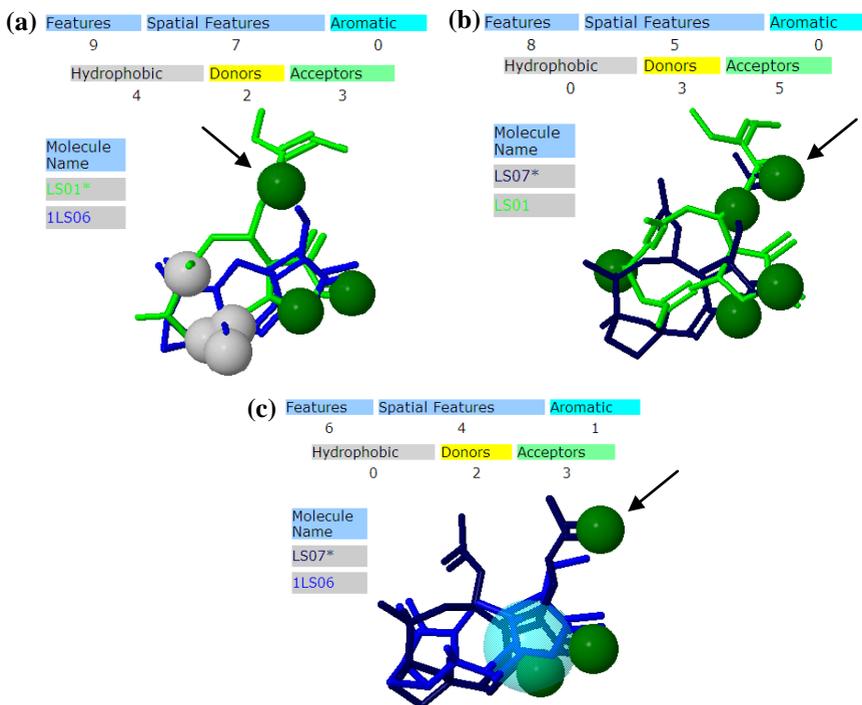
**Figura 25.** Alinhamento de LS01, LS02 e LS03.

Alinhamento de LS01, LS02 e LS03, realizado pelo programa PharmaGist, considerando-se características espaciais e de ligação. Features: Características alinhadas. Spatial Features: Características espaciais alinhadas. Aromatic: anéis aromáticos alinhados. Hydrophobic: regiões hidrofóbicas alinhadas. Donors: doadores de ligação hidrogênio alinhados. Acceptors: aceptores de ligação hidrogênio alinhados. Fonte: a autora.

Com o objetivo de explorar as características que possam ser mais importantes para a atividade antimicrobiana, observou-se

também o alinhamento das moléculas que apresentaram melhor atividade: LS01, LS06 e LS07 – MIC = 6,25 µg/mL. Quando estas moléculas foram alinhadas aos pares, observou-se que LS01 e LS06 alinharam, além dos DH e AH do anel lactônico, 4 HFB (figura 26a). Já quando LS07 foi alinhada com estas moléculas, nenhuma HFB foi alinhada (figuras 26b e 26c). Entretanto, entre todos os pares, observou-se o alinhamento de um novo AH (indicado pela flecha nas figuras 26 a, b, c). Ao alinhar as três moléculas em conjunto, observou-se que este terceiro AH manteve-se no alinhamento, além de alinhar o anel lactônico e uma HFB (figura 27).

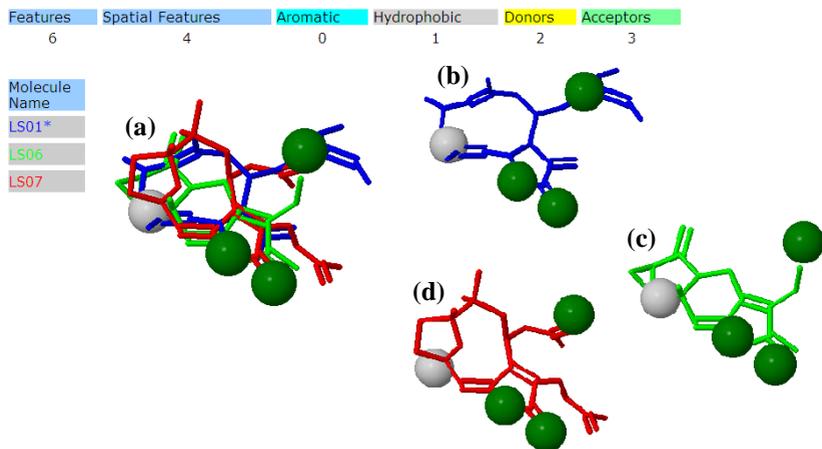
**Figura 26.** Alinhamento de LS01, LS06 e LS07 aos pares.



Alinhamento de LS01, LS06 e LS07, aos pares, realizado pelo programa PharmaGist, considerando-se características espaciais e de ligação. (a) LS01 e LS06. (b) LS01 e LS07. (c) LS06 e LS07. A flecha indica o terceiro grupamento aceptor de ligação hidrogênio encontrado nos três alinhamentos. Features: Características alinhadas. Spatial Features: Características espaciais alinhadas. Aromatic: anéis aromáticos alinhados. Hydrophobic: regiões hidrofóbicas

alinhadas. Donors: doadores de ligação hidrogênio alinhados. Acceptors: aceptores de ligação hidrogênio alinhados. Fonte: a autora.

**Figura 27.** Alinhamento de LS01, LS06 e LS07.



Alinhamento de LS01, LS06 e LS07, realizado pelo programa PharmaGist, considerando-se características espaciais e de ligação. (a) LS01 LS06 e LS07. (b) LS01 somente. (c) LS06 somente. (d) LS07 somente. Features: Características alinhadas. Spatial Features: Características espaciais alinhadas. Aromatic: anéis aromáticos alinhados. Hydrophobic: regiões hidrofóbicas alinhadas. Donors: doadores de ligação hidrogênio alinhados. Acceptors: aceptores de ligação hidrogênio alinhados. Fonte: a autora.

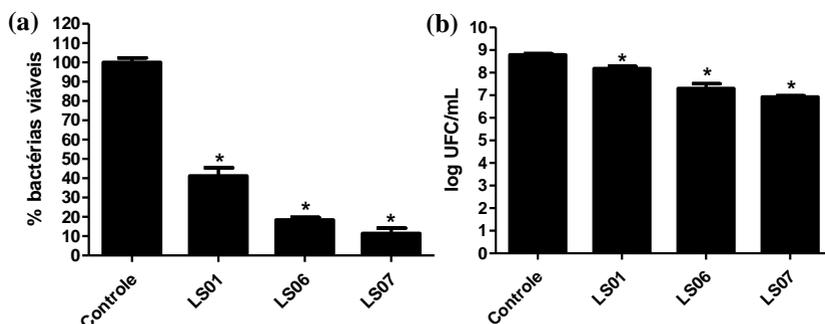
### 6.3 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO

Como mencionado anteriormente, o primeiro passo para iniciar os estudos do mecanismo de ação foi determinar a MIC dos compostos no laboratório em que as técnicas seriam executadas e com a mesma metodologia que seria realizada no tratamento para os *microarrays*: cultura líquida. Os compostos disponibilizados para o estudo do mecanismo de ação foram LS01, LS05, LS06 e LS07. Como já descrito no item 6.1, as MIC obtidas para estes compostos em cultura líquida foram 25 µg/mL, 50 µg/mL, 12,5 µg/mL e 12,5 µg/mL,

respectivamente. Baseando-se no resultados da MIC e das curvas de tempo de morte, decidiu-se excluir o composto LS05.

Estabelecida a MIC, os compostos foram testados em culturas líquidas de *M. tuberculosis*, em concentrações 10 vezes superiores, durante 24 horas. Pode-se observar na figura 28 que os compostos reduziram a viabilidade bacteriana após o tratamento, tanto quando o efeito foi analisado utilizando-se o kit BacTiter-Glo™ (figura 26a), quanto ao realizar a quantificação de UFC.

**Figura 28.** Efeito dos compostos LS01, LS06 e LS07 na viabilidade de *M. tuberculosis* em cultura líquida, após tratamento por 24 horas, em concentrações correspondentes a 10xMIC.

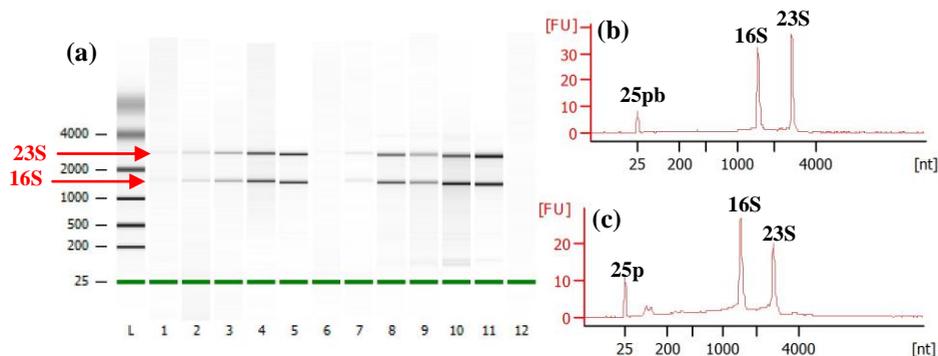


(a) Análise da viabilidade bacteriana utilizando-se o kit BacTiter-Glo™ após 24 horas de tratamento com LS01, LS06 e LS07. Controle: culturas tratadas com o veículo dos compostos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes. (b) Análise da viabilidade bacteriana pela quantificação de UFC/mL após subcultivo em meio 7H10. Controle: culturas tratadas com o veículo dos compostos. UFC: unidades formadoras de colônia. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de experimento representativo da duplicata biológica. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$  pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni. Fonte: a autora.

O volume de cultura líquida tratada para posterior extração de RNA e execução dos *microarrays* foi estabelecido após análise dos resultados de extrações de RNA partindo-se de diferentes volumes de cultura líquida de *M. tuberculosis*. O rendimento com o uso do protocolo de extração incluindo a etapa de precipitação de ácidos nucleicos foi de 2 ng/ $\mu$ L, 3 ng/ $\mu$ L, 17 ng/ $\mu$ L, 17 ng/ $\mu$ L e 91 ng/ $\mu$ L de

RNA em volumes de 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL e 10 mL. Já o protocolo sem a etapa de precipitação foi capaz de recuperar 2 ng/ $\mu$ L, 2 ng/ $\mu$ L, 8 ng/ $\mu$ L, 11 ng/ $\mu$ L e 55 ng/ $\mu$ L, para os mesmos volumes (figura 29). Apesar de o rendimento do primeiro protocolo parecer levemente superior ao segundo, observou-se, ao analisar os eletroferogramas fornecidos pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, que havia mais ruídos no protocolo incluindo a precipitação (figura 29c) em comparação ao outro (figura 29b). Além disso, foram observados picos de baixo peso molecular, que podem ser correspondentes a pequenos RNAs (sRNA, do inglês, *small RNA*) e RNA transportador (tRNA) e que preferencialmente devem ser evitados para uso posterior no processo de amplificação de RNA.

**Figura 29.** Rendimento da extração de RNA a partir diferentes volumes de cultura líquida de *M. tuberculosis*.



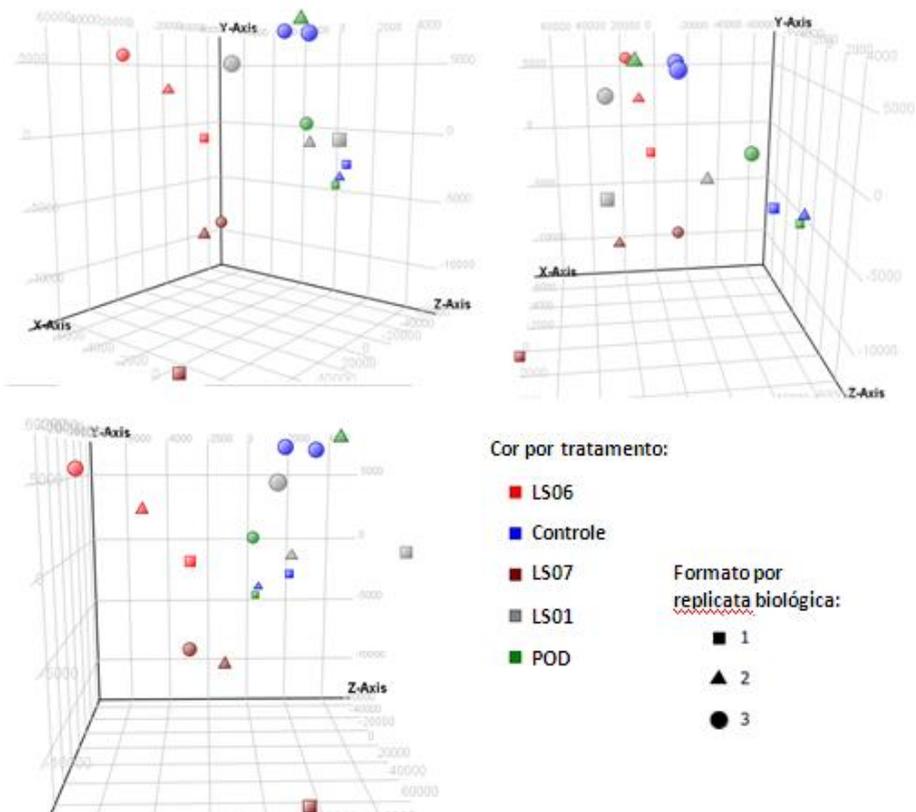
Rendimento da extração de RNA a partir de cultura líquida de *M. tuberculosis*, utilizando-se guanidina 5M. Análise pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer. (a) Imagem de eletroforese capilar de RNA representativa da recuperação de RNA de *M. tuberculosis* a partir de diferentes volumes de cultura líquida. L = do inglês, *ladder* – padrão de tamanho molecular. De 1 a 5: amostras de RNA extraídas sem a etapa de precipitação de ácidos nucleicos. 1: 0,5 mL. 2: 1,0 mL. 3: 2,0 mL. 4: 5,0 mL. 5: 10 mL. De 6 a 10: amostras de RNA extraídas utilizando-se protocolo com etapa de precipitação de ácidos nucleicos. 6: 0,5 mL. 7: 1,0 mL. 8: 2,0 mL. 9: 5,0 mL. 10: 10 mL. 11: amostra controle de RNA de *M. tuberculosis*. 12: água. (b) Eletroferograma representativo da extração de RNA por protocolo sem a etapa de precipitação de ácidos nucleicos. (c) Eletroferograma representativo da extração de RNA incluindo etapa de precipitação de ácidos nucleicos. 25pb: 25 pares de base.

16S: subunidade 16S do RNA ribossômico. 23S: subunidade 23S do RNA ribossômico. Fonte: a autora.

Com base nos resultados obtidos até então e na quantidade dos compostos disponível para o estudo, optou-se por realizar o tratamento das culturas líquidas de *M. tuberculosis* com os compostos em concentrações correspondentes a 10xMIC, durante 4 horas, em volumes de 3 mL, utilizando-se o protocolo de extração de RNA sem precipitação de ácidos nucleicos, seguido de amplificação do RNA extraído.

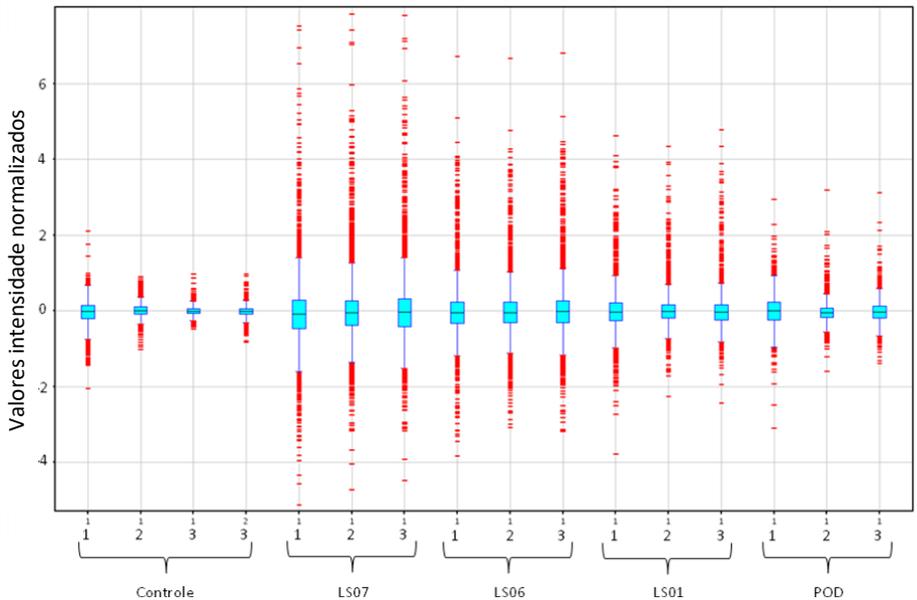
Quando os dados obtidos com os *microarrays* foram analisados, inicialmente avaliou-se a similaridade dos resultados entre as triplicatas biológicas. A análise dos dados utilizando-se o teste *Principal Component Analysis* (PCA) demonstrou que as triplicatas biológicas foram semelhantes entre si, como pode ser observado na figura 30. Ainda, pode-se verificar que os pontos referentes à LS06 e LS07 estão mais distantes dos demais pontos, indicando que há mais diferenças destas amostras em relação ao controle tratado com o veículo dos compostos. O mesmo pode ser observado na figura 31, após os dados serem normalizados: há um maior número de genes com expressão alterada em LS06 e LS07 em relação aos demais. Além disso, as triplicatas biológicas apresentam o mesmo padrão.

**Figura 30.** Gráficos representativos do teste *Principal Component Analysis*.



Diferentes ângulos da imagem em 3 dimensões obtida na análise dos dados dos *microarrays* pelo teste *Principal Component Analysis*. Controle: *M. tuberculosis* H37Rv tratado com o veículo dos compostos. POD: podoandina.  
Fonte: a autora.

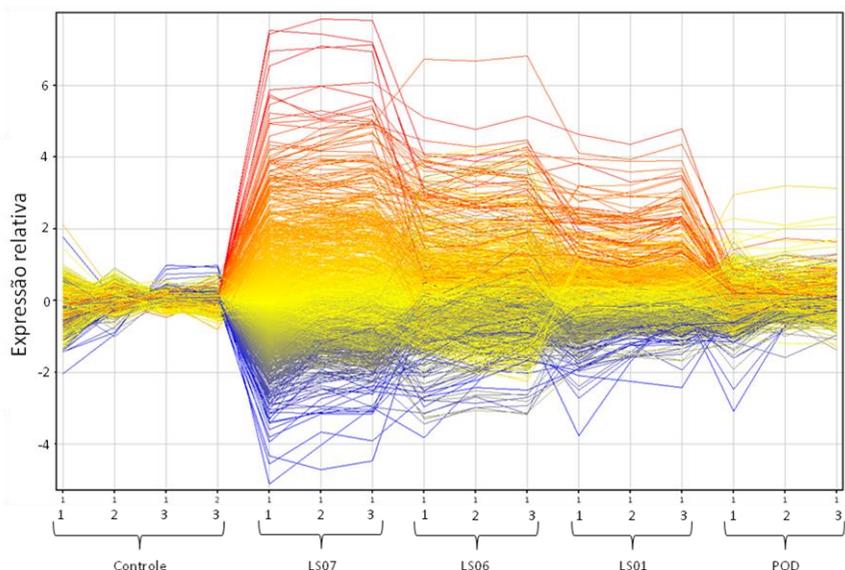
**Figura 31.** Expressão relativa de *M. tuberculosis* tratado com LS01, LS06, LS07 ou POD, após normalização dos dados.



Cada ponto vermelho representa um gene. As linhas horizontais representam a variação na expressão gênica. As linhas verticais representam as replicatas biológicas de cada tratamento. Controle: *M. tuberculosis* tratado com o veículo dos compostos. POD: podoandina. Fonte: a autora.

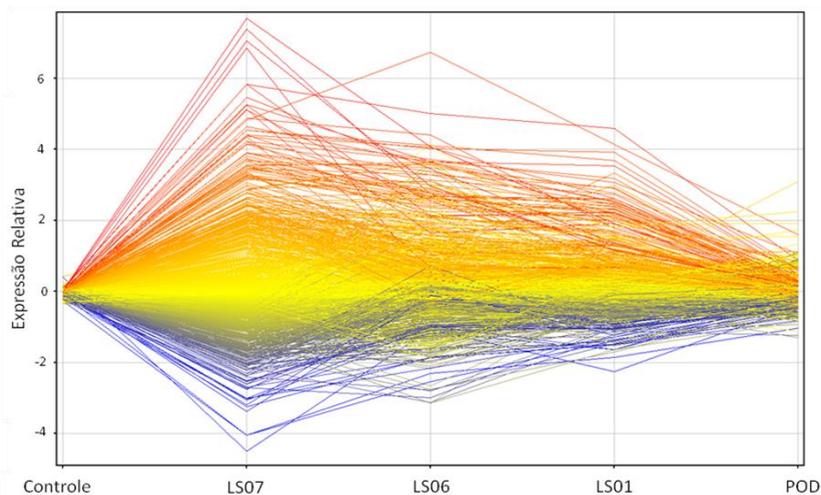
A figura 32 apresenta um gráfico representativo da intensidade das alterações na expressão dos principais genes após tratamento com os compostos, nas triplicatas biológicas de cada tratamento. Quando cada gene foi avaliado entre as triplicatas, pode-se observar que a intensidade de variação na expressão gênica é muito semelhante, o que permitiu que as triplicatas fossem agrupadas em um único ponto (figura 33). A figura 33 apresenta um gráfico semelhante ao da figura 32, com as triplicatas biológicas agrupadas, facilitando a comparação entre os genes. Pode-se observar que os compostos LS01, LS06 e LS07 compartilham diversos genes com expressão alterada, o que não ocorre com POD.

**Figura 32.** Gráfico representativo da expressão relativa das triplicatas biológicas de *M. tuberculosis* após tratamento com LS01, LS06, LS07 e POD.



Alterações na expressão dos principais genes, após normalização dos dados. Cada linha colorida (vermelho, amarelo e azul) representa um gene, enquanto as colunas representam as triplicatas biológicas dos diferentes tipos de tratamento. Linhas vermelhas representam os genes com maior intensidade de superexpressão, enquanto as linhas azuis representam genes com maior intensidade de subexpressão. Linhas amarelas representam genes com alteração intermediária na expressão. Controle: cultura de *M. tuberculosis* tratada com o veículo dos compostos. POD: podoandina. Fonte: a autora.

**Figura 33.** Gráfico representativo das alterações na expressão dos principais genes após tratamento com os compostos LS01, LS06, LS07 e POD.

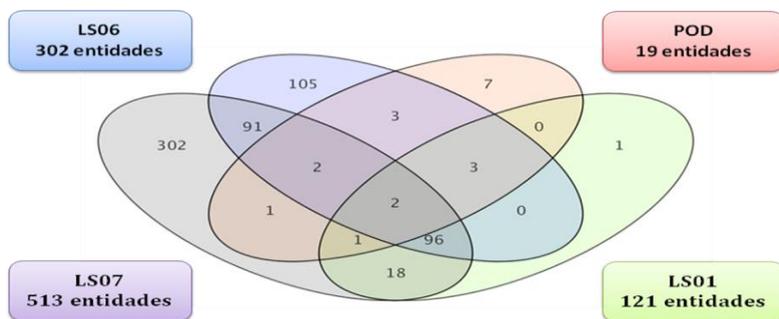


Alterações na expressão dos principais genes após normalização dos dados. Cada linha colorida (vermelho, amarelo e azul) representa um gene, enquanto as colunas representam os diferentes tipos de tratamento. Linhas vermelhas representam os genes com maior intensidade de superexpressão, enquanto as linhas azuis representam genes com maior intensidade de supraexpressão. Linhas amarelas representam genes com alteração intermediária na expressão. Controle: cultura de *M. tuberculosis* tratada com o veículo dos compostos. POD: podoandina. Fonte: a autora.

Após análise estatística, os dados obtidos com o *microarray* indicaram que culturas de *M. tuberculosis* expostas a LS01 10xMIC apresentaram alterações na expressão de 121 genes, em mais de 2 vezes, de forma estatisticamente significativa em relação ao controle tratado com o veículo dos compostos. Destes, 96 foram superexpressos e 25 tiveram sua expressão reduzida. Quando expostas a LS06, 302 genes foram diferencialmente expressos, sendo 176 superexpressos e 126 supraexpressos. Já a exposição à LS07 levou à indução de 263 genes e à repressão de 250, totalizando 513 genes com expressão alterada de forma significativa. Quando as culturas foram expostas à podoandina (POD), LS que não apresenta atividade frente a *M. tuberculosis*, houve expressão diferenciada de somente 19 genes (18 superexpressos e 1

supraexpresso). Quando os compostos foram analisados em conjunto, observou-se que LS01, LS06 e LS07 compartilharam 80 genes superexpressos e 16 genes supraexpressos. Já LS06 e LS07 compartilharam 127 genes superexpressos e 57 genes supraexpressos (figura 34). A lista completa dos genes que tiveram sua expressão alterada em cada tratamento pode ser encontrada nos Apêndices A (LS01), B (LS06), C (LS07), D (POD), E (genes em comum entre LS01, LS06 e LS07) e F (genes em comum entre LS06 e LS07).

**Figura 34.** Número total de genes com expressão diferenciada após tratamento de *M. tuberculosis* com LS01, LS06, LS07 ou POD.



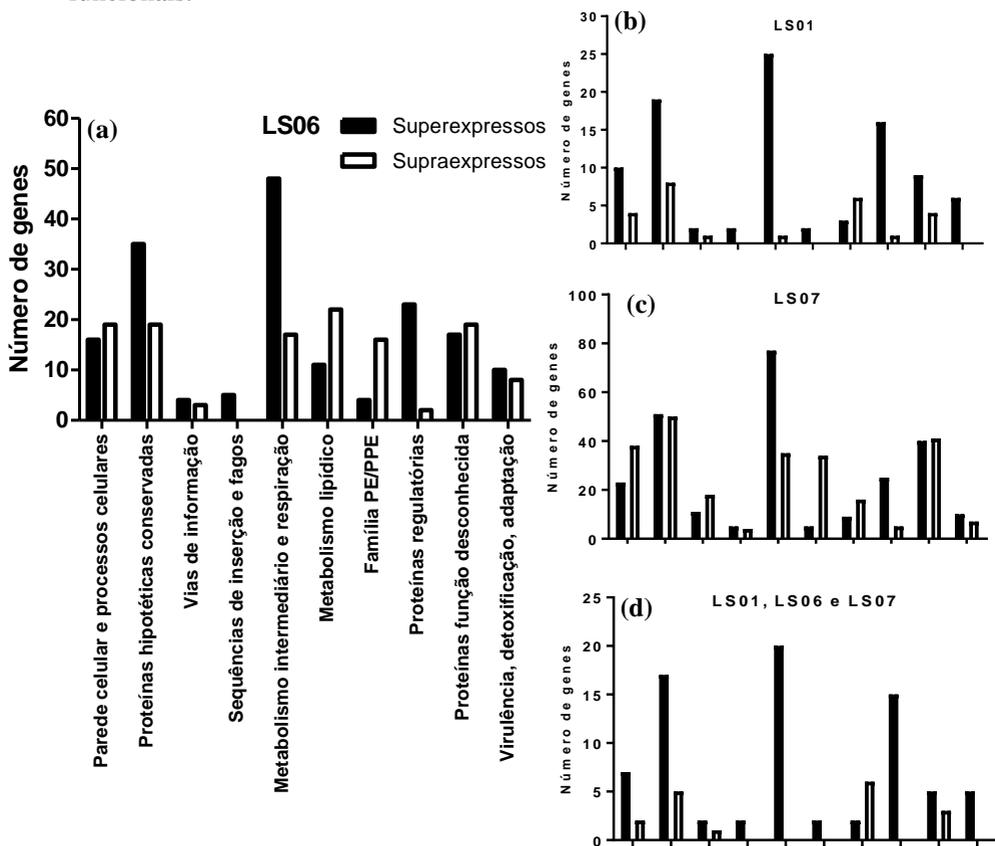
Número total de genes com expressão diferenciada após tratamento com cada composto e genes compartilhados entre os diferentes tratamentos. POD: podoandina. Fonte: a autora.

Quando os genes foram categorizados por função, observou-se que o tratamento com os três compostos apresentou o mesmo padrão de alteração de expressão gênica. Quando os genes levados à superexpressão foram avaliados, houve predomínio daqueles pertencentes à categoria de metabolismo intermediário e respiração, seguido de proteínas hipotéticas conservadas e proteínas regulatórias. Quanto aos genes supraexpressos, o número de genes pertencentes às categorias parede celular e processos celulares, proteínas hipotéticas conservadas, metabolismo intermediário e respiração, família PE/PPE (prolina-ácido glutâmico/ prolina-prolina-ácido glutâmico) e proteínas de função desconhecida foi muito semelhante (figura 35).

A análise de probabilidade hipergeométrica indicou que o perfil de alteração na expressão gênica obtido com o tratamento com as LS

assemelha-se ao perfil de resposta ao stress oxidativo por espécies reativas de oxigênio (EROs), com destaque para a superexpressão dos genes que codificam tiorredoxinas (*trxA*, *trxB*, *trx-2*, *thiX*), proteínas envolvidas na biossíntese de cisteína (*cysA*, *cysK2*, *cysM*, *cysW*, *cysT*), proteínas envolvidas na síntese de molibdopterina (*moeB1*, *moaE1*), proteínas envolvidas no metabolismo da glicose (*rmlB* e *rmlC*) e da ribose (*rpiB*), proteínas envolvidas na biossíntese de arginina (*argB*, *agrC*, *argD*, *argF*, *argG*, *argH*, *argJ* e *argR*), proteínas *heat shock* (*hsp* e *clpB*), a enzima catalase-peroxidase (*katG*) e fatores sigma (*rpoE* ou *sigH*, *sigE*). Os genes supraexpressos representam uma resposta mais inespecífica, associada a uma redução geral no crescimento bacteriano, com destaque para genes envolvidos no crescimento exponencial, como o cluster *mbt* (*mbtA*, *mbtB*, *mbtC*, *mbtD*, *mbtD*, *mbtE*, *mbtF*, *mbtG*, *mbtH*, *mbtI*) e o gene *rpfC*.

**Figura 35.** Genes super e supraexpressos após tratamento de *M. tuberculosis* com LS01, LS06 e LS07, divididos por categorias funcionais.

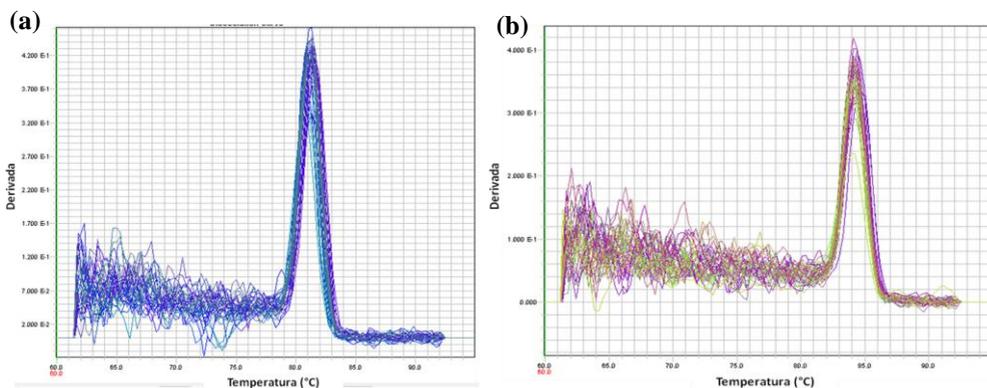


Número de genes super e supraexpressos, divididos em categorias funcionais, após exposição a LS01 (b), LS06 (a) e LS07 (c). Em (d), análise dos genes em comum alterados pelo tratamento com os três compostos individualmente. Fonte: a autora.

A fim de validar os resultados obtido no *microarray*, foi realizada qPCR para nove genes super ou supraexpressos no *microarray*, selecionados de forma aleatória. As curvas de dissociação apresentaram pico único para todos os genes estudados (figura 36) e temperatura de dissociação ( $T_M$ ) específica para seus respectivos

produtos de amplificação (tabela 13), o que indica ausência de dímeros e produtos inespecíficos nas reações. O tamanho dos produtos de amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de agarose, como pode ser observado na figura 37.

**Figura 36.** Curvas de dissociação dos genes 16S rRNA (a) e *arsC* (b).

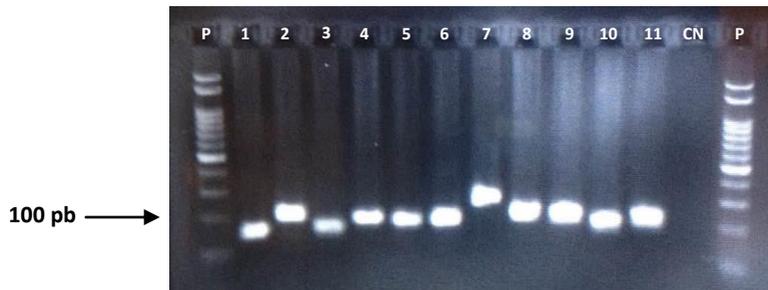


Fonte: a autora.

**Tabela 13.** Temperaturas de dissociação ( $T_M$ ) dos produtos de amplificação da qPCR.

	<i>Primers</i>	$T_M$ (°C)
<b>Genes referência</b>	16S RNA	81,1
	<i>polA</i>	84,9
	<i>thiX</i>	83,9
	<i>gltA1</i>	83,5
	<i>trxA</i>	81,8
<b>Genes alvo</b>	<i>arsC</i>	84,2
	<i>rpfC</i>	86,6
	PE15	85,9
	PE31	84,6
	<i>rpoE</i>	79,8
	<i>moeB1</i>	83,3

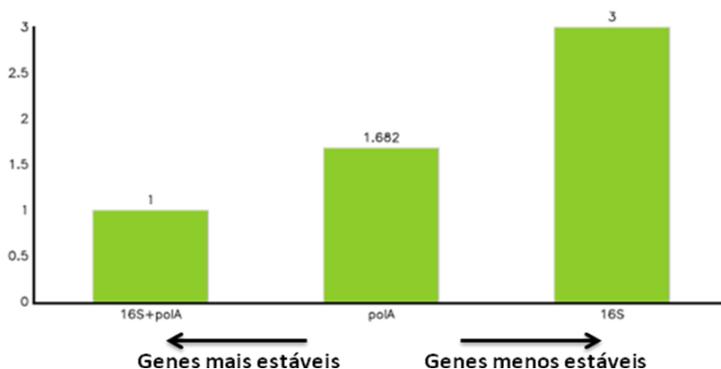
**Figura 37.** Produtos de amplificação visualizados após eletroforese em gel de agarose.



Produtos de amplificação de todos os iniciadores utilizados no estudo após eletroforese em gel de agarose 2,5% (80V/ 40 minutos), corados por brometo de etídio. P: padrão de tamanho molecular de 50 pb. 1: *rpoE*. 2: *thiX*. 3: *moeB1*.; 4: *gltA1*. 5: *trxA*. 6: *arsC*. 7: *rpfC*. 8: PE15. 9: PE31. 10: *polA*. 11: 16S rRNA. CN: controle negativo da reação. Fonte: a autora.

Para a normalização dos resultados, foi utilizada a média geométrica dos valores obtidos para os genes 16S rRNA e *polA*. Segundo os resultados obtidos utilizando-se a ferramenta *online* RefFinder, a combinação dos dois genes apresenta maior estabilidade para normalização dos resultados nas condições experimentais utilizadas (figura 38).

**Figura 38.** Gráfico representativo da variação da estabilidade dos genes de referência 16S rRN e *polA*.



*Ranking* fornecido pelo programa RefFinder, relativo à estabilidade dos genes de referência e suas combinações. Quanto menor o valor no *ranking*, maior a estabilidade do gene ou da combinação. Fonte: a autora.

Para todos os pares de iniciadores utilizados na qPCR, os valores de eficiência ficaram dentro do intervalo ideal de 1,8 a 2,0, com valores de correlação ( $R^2$ ) superiores a 0,995, como pode ser visualizado na tabela 14. Isto significa que as reações apresentaram médias de eficiência comparáveis, permitindo o uso do método de Cq comparativo para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo.

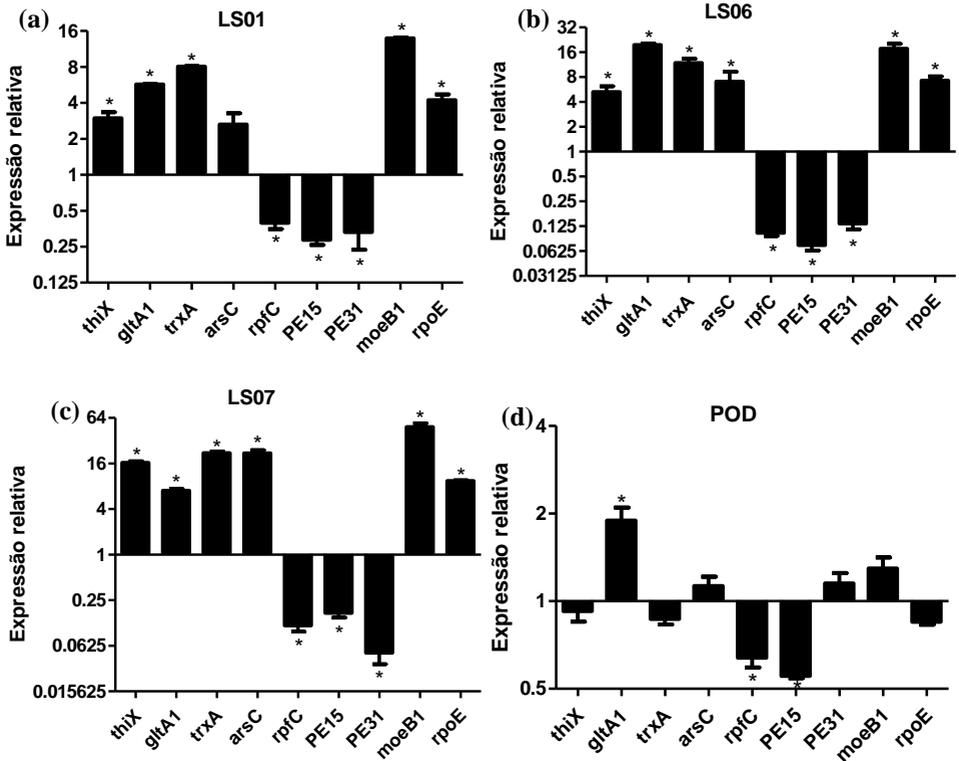
**Tabela 14.** Eficiência dos iniciadores utilizados na qPCR.

	<b>Iniciadores</b>	<b>Eficiência</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Genes de referência</b>	16S RNA	1,88	0,997292
	<i>polA</i>	1,90	0,997359
	<i>rpoE</i>	1,89	0,997376
	<i>gltA1</i>	1,91	0,997776
	<i>trxA</i>	1,95	0,997670
<b>Genes alvo</b>	<i>thiX</i>	1,91	0,997483
	<i>arsC</i>	1,90	0,997332
	<i>rpfC</i>	1,90	0,998221
	PE15	1,93	0,997145
	PE31	1,91	0,997703
	<i>moeB1</i>	1,90	0,997734

Eficiência dos iniciadores calculada utilizando-se o programa LinRegPCR.

Os resultados do *microarray* foram validados pela qPCR. O perfil da expressão relativa das amostras de *M. tuberculosis* tratadas com LS01, LS06, LS07 e POD, por qPCR, pode ser visualizado na figura 39. Pode-se verificar que as amostras tratadas com LS01, LS06 e LS07 apresentam perfil de expressão semelhante, enquanto a expressão relativa em amostras tratadas POD, LS sem atividade antimicobacteriana, são menores que 2 (ponto de corte utilizado na análise dos *microarrays*). A comparação dos resultados obtidos no *microarray* e na qPCR pode ser visualizada na tabela 15. Pode-se observar que houve concordância entre as duas metodologias: os genes super e supraexpressos no *microarray* tiveram comportamento muito semelhante quando analisados por qPCR.

**Figura 39.** Expressão relativa dos genes selecionados para validação do *microarray*, após tratamento de *M. tuberculosis* com LS01 (a), LS06 (b), LS07 (c) e POD (d).



Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de da triplicata biológica.  
 \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$  pelo teste  $t$  de Student. Fonte: a autora.

**Tabela 15.** Comparação dos dados de expressão relativa obtido no *microarray* e na qPCR.

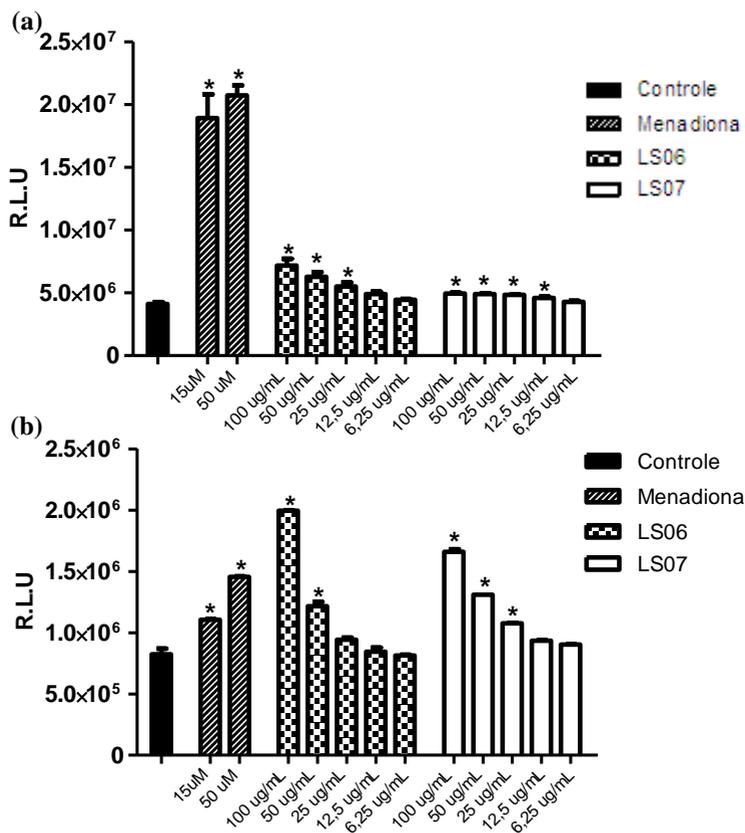
Gene	Método	LS01	LS06	LS07
<i>thiX</i>	<i>Microarray</i>	4,437	4,366	18,538
	qPCR	2,987	5,308	16,437
<i>gltA1</i>	<i>Microarray</i>	4,676	12,790	7,582
	qPCR	5,728	19,638	7,028
<i>trxA</i>	<i>Microarray</i>	5,473	6,375	9,083
	qPCR	8,069	11,897	22,063
<i>arsC</i>	<i>Microarray</i>	3,670	6,691	17,333
	qPCR	2,025	7,048	21,857
<i>rpfC</i>	<i>Microarray</i>	-2,016	-7,902	-6,544
	qPCR	-2,534	-9,631	-8,674
PE15	<i>Microarray</i>	-2,303	-8,747	-4,415
	qPCR	-3,520	-13,569	-5,899
PE31	<i>Microarray</i>	-2,485	-3,365	-15,675
	qPCR	-3,019	-7,448	-19,806
<i>moeB1</i>	<i>Microarray</i>	7,665	9,955	15,283
	qPCR	13,914	17,682	48,638
<i>rpoE</i>	<i>Microarray</i>	4,740	6,181	9,292
	qPCR	4,222	7,283	9,439

Números negativos indicam supraexpressão.

Com o objetivo de avaliar os resultados obtidos no *microarray*, utilizou-se o kit ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay, para detecção de EROs produzidas em *M. tuberculosis* após tratamento com LS06 e LS07. Como descrito anteriormente, os testes foram feitos em cultura celular, conforme indicado pelo fabricante do kit, e em cultura líquida de *M. tuberculosis*, com auxílio da assessoria científica do fabricante. Quando testados em células de linhagem THP-1, LS06 apresentou produção de EROs estatisticamente significativa em relação ao controle nas concentrações 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. Já LS07 apresentou produção significativa de EROs nas concentrações 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL (figura 40a). Observou-se ainda que os valores de RLU obtidos após o tratamento com as LS são nitidamente inferiores aos obtidos com o tratamento com menadiona. Ainda, a produção de ROS por LS06 parece ser dependente da concentração, enquanto a atividade de LS07, não. Quando o teste foi utilizado em *M. tuberculosis*, houve detecção de produção de EROs induzida por

menadiona, utilizada como controle positivo da reação, validando o teste neste microrganismo (figura 40b). Neste mesmo ensaio, observou-se que LS06, nas concentrações 100 µg/mL e 50 µg/mL, e LS07, nas concentrações 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL induziram a produção de EROs em *M. tuberculosis* de forma estatisticamente significativa e de forma dependente da concentração.

**Figura 40.** Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio por LS06 e LS07.



Detecção de espécies reativas de oxigênio utilizando-se o kit ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay em (a) células de linhagem THP-1 e (b) *M. tuberculosis* H37Rv. RLU: do inglês *Relative Light Unit* – Unidades Relativas de Luz. Controle: células em (a) ou *M. tuberculosis* em (b), tratados com o veículo dos compostos. Menadiona: controle positivo de produção de espécies reativas de oxigênio. Cada ponto

representa a média  $\pm$  EPM.\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$  pelo teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. Fonte: a autora.

Quanto à seleção de mutantes espontâneos, assim como no *microarray*, foram utilizados os compostos LS01, LS06 e LS07. A primeira abordagem, utilizando meios sólidos 7H10 contendo altas concentrações dos compostos, permitiu o isolamento de colônias somente nos meios contendo LS07. Sete colônias foram isoladas e a resistência foi confirmada para todas. Já com a segunda abordagem, em que o tratameto com os compostos foi feito inicialmente em meio líquido, foram isoladas e confirmadas 3 colônias resistentes a LS06 (em concentrações 4xMIC) e 6 colônia resistentes a LS07 (em concentrações 10xMIC).

Infelizmente, a análise do sequenciamento do genoma completo não pôde ser finalizada antes da entrega deste trabalho.

## 7 DISCUSSÃO

A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose (TB) são considerados urgentes, visto que há necessidade de esquemas mais curtos, simples e acessíveis, que permitam aumento da adesão ao tratamento, prevenção do desenvolvimento de resistência e tratamento eficaz de cepas resistentes a múltiplos fármacos (MDR) (GINSBERG, 2010; WHO, 2013; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013). Produtos naturais representam importantes fontes para o desenvolvimento de novos fármacos e vêm desempenhando um papel importante no tratamento da TB, o que estimula a busca por novos compostos com atividade frente a *M. tuberculosis* originados de fontes naturais (GUZMÁN et al., 2012; SALOMON; SCHMIDT, 2012; NGUTA et al., 2015).

A atividade antimicobacteriana ainda não havia sido reportada para o gênero *Calea*. Neste estudo, o extrato bruto e as frações hexânica, acetato de etila e diclorometano de *C. uniflora* (ECU, FHCU, FACU e FDCU respectivamente) e a fração diclorometano de *C. pinnatifida* (FDCP) apresentaram atividade frente à cepa referência *M. tuberculosis* H37Rv. Destaca-se a atividade de FDCU e FDCP, que apresentaram concentração inibitória mínima (MIC) de 25 µg/mL e das quais foram isoladas as lactonas sesquiterpênicas (LS), compostos que apresentaram as melhores atividades frente a *M. tuberculosis*. Os valores iguais de MIC de FDCP e de LS05 (25 µg/mL), única LS isolada desta fração, podem indicar que existam mais compostos com atividade antimicobacteriana nesta fração.

Os valores de MIC relatados na literatura para extratos obtidos de plantas variam muito, desde valores na ordem de mg/mL até ng/mL (PHONGPAICHIT et al., 2006; RAMOS et al., 2008; TEKWU et al., 2012; GEMECHU et al., 2013; ROBLES-ZEPEDA et al., 2013; MARTINS et al., 2013; ABUZEID et al., 2014; NGUTA et al., 2016). De forma diferente do presente trabalho, diversos desses estudos (PHONGPAICHIT et al., 2006; TEKWU et al., 2012; ABUZEID et al., 2014; NGUTA et al., 2016) baseiam-se nos preceitos da etnofarmacologia, testando extratos obtidos de plantas usadas popularmente para tratar TB e/ou outras doenças infecciosas, especialmente nos continentes Africano e Asiático. Apesar das importantes informações obtidas com a MIC de extratos de plantas, estas podem ser ou não indicadores confiáveis das chances de sucesso no isolamento de potentes agentes com atividade antimicobacteriana.

Existe a possibilidade, por exemplo, de um extrato com MIC relativamente baixa (ou seja, com alta atividade) ser constituído de altas concentrações de poucos compostos majoritários que apresentam atividades moderadas frente a *M. tuberculosis*. Ou, ainda, há a possibilidade de efeito sinérgico entre seus componentes, que quando isolados, têm sua atividade reduzida. Já extratos que apresentam atividades moderadas podem conter componentes minoritários que, após isolados, podem apresentar potente atividade antimicobacteriana (PAULI et al., 2005).

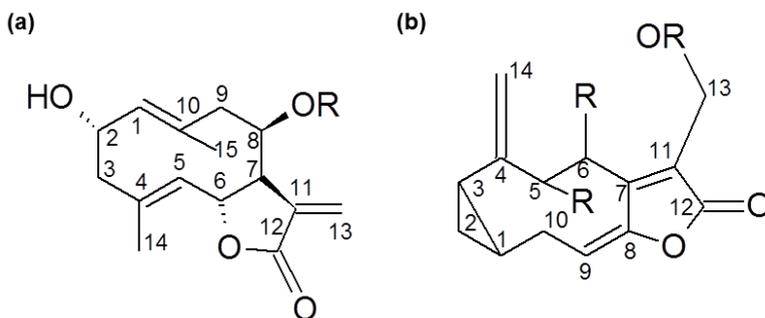
Segundo Pauli e colaboradores (2005), produtos naturais de uma mesma classe química, que apresentem atividade antimicobacteriana consistente, mesmo que moderada, devem ser considerados igualmente ou mais atrativos para estudo, em comparação a um composto único com potente atividade, mas que não tenha análogos naturais que apresentem atividade. Por isso, abordagens utilizando fracionamento dos extratos são importantes na busca de novos fármacos, favorecendo o isolamento e a caracterização de componentes minoritários, que podem ter potentes atividades, além de aumentar as chances de isolamento de moléculas estruturalmente relacionadas. Como resultado, estudos de relação estrutura-atividade podem ser realizados, facilitando a identificação de estruturas importantes para a atividade das moléculas. Neste trabalho, as LS estudadas foram isoladas das frações diclorometano de *C. uniflora* e *C. pinnatifida* e se destacaram em sua atividade frente a *M. tuberculosis*. Todas as estruturas isoladas pertencentes a esta classe apresentaram atividade antimicobacteriana, com valores de MIC variando entre 6,25 e 25 µg/mL. A escolha de moléculas pertencentes à mesma classe química para dar continuidade aos estudos permitiu a comparação de resultados entre alguns ensaios e que estudos de relação estrutura-atividade pudessem ser feitos.

As LS têm sido amplamente estudadas devido a uma série de atividades biológicas relacionadas ao seu esqueleto carbônico, como atividade antiinflamatória, citotóxica, antitumoral, antibacteriana e antifúngica (PICMAN, 1986; DEWICK, 2002; REPETTO; BOVERIS, 2010). Estudos demonstraram que estas substâncias têm propriedades químicas características, como reatividade do centro alquilante, lipofilicidade, caráter eletrônico e geometria molecular, que estão relacionadas às suas atividades biológicas (GHANTOUS et al., 2010).

Como mencionado anteriormente, as LS são constituídas por 15 carbonos, consistindo basicamente de três unidades de isopreno e um grupo lactona e podem ser classificadas de acordo com o esqueleto

carbônico (CHATUVERDI, 2011). Dentre os mais de 30 tipos de carboesqueletos já descritos, os compostos LS01, LS02, LS03 e LS04 são classificados como germacranolídeos (figura 41a), biogeneticamente considerados como precursores dos demais (SCHMIDT, 2006), enquanto os compostos LS06 e LS07 são derivados dos eudesmanolídeos modificados, sendo classificados como lindenanolídeos (figura 41b) (BOHLMAN et al., 1981). Dentre os germacranolídeos estudados, o composto LS01 apresentou o menor valor de MIC (6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mesmo obtido pelos lindenanolídeos LS06 e LS07.

**Figura 41.** Esqueletos carbônicos numerados das LS do tipo germacranolídeos (a) e lindenanolídeos (b).



Em revisão da atividade antimicrobacteriana de mais de 50 LS pertencentes aos grupos germacranolídeos, guaianolídeos e eudesmanolídeos, Cantrell e colaboradores (2001) relataram que as MIC destes compostos variaram entre 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente a *M. tuberculosis*, valores semelhantes aos encontrados neste estudo. Quando estudos mais recentes foram avaliados, o mesmo padrão foi encontrado. LS isoladas de *Camchaya calcarea* apresentaram MIC entre 1,5 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente a *M. tuberculosis* H37Rv (VONGVANICH et al., 2006), enquanto aquelas isoladas de *Laurus* spp., entre 6,25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (LUNA-HERRERA et al., 2007). Já LS isoladas de *Ambrosia confertiflora* apresentaram MIC de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (CORONADO-ACEVES et al., 2016). A presença do exociclo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona atuando como um centro alquilante é tido como

presença essencial para a atividade contra o bacilo, uma vez que a abertura do anel lactona induz a perda desta atividade. No entanto, a simples presença do anel lactônico não garante a atividade contra o bacilo (FISCHER et al., 1998). Em estudo de Amoah e colaboradores (2013), por exemplo, LS isoladas de *Hedyosmum brasiliense* não apresentaram atividade antimicobacteriana. A presença de outros sítios ativos reacionais eletrodeficientes como carbonilas  $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas, epóxidos e/ou outros intermediários carbocatiônicos parecem aumentar a atividade antimicobacteriana (FISHER et al., 1998; CANTRELL; FRANZBLAU; FISHER, 2001). Estes sítios reativos são encontrados nos compostos avaliados neste estudo, como descrito a seguir.

A subestrutura carbonílica  $\alpha$ , $\beta$ -insaturada ocorre em  $\gamma$ -lactonas com grupo metilênicoexocíclico em  $\alpha$  à carbonila e também pode ocorrer em subestruturas análogas presentes em alguns ésteres conjugados ao carbono 8, sendo considerada como um farmacóforo, uma vez que este tipo de subestrutura reage facilmente com nucleófilos, que podem ser resíduos sulfidrila de cisteína no DNA por exemplo, formando ligações covalentes, o que corrobora as informações da tabela 11, que indica que estas moléculas podem atuar como inibidores enzimáticos e ligantes de receptores nucleares (RÜNGELER et al., 1999). Em todos os compostos testados neste estudo, esta subestrutura se faz presente e pode ser considerada responsável pela atividade antimicobacteriana observada.

Nos germacranolídeos (LS01, LS02, LS03 e LS04), a deficiência eletrônica gerada no carbono 10, em intermediários reacionais, também pode atuar como um terceiro centro de alquilação nucleofílica, o que também facilitaria a formação de ligações covalentes com um sítio ativo enzimático, levando a uma inibição irreversível, o que também corrobora as informações da tabela 11. A este fato pode ser atribuído a melhor atividade do composto LS01 em relação ao composto LS04, no qual a substituição do grupo metil por metil acetato na posição C10 pode proteger (latenciar) este sítio reacional, tornando-o estericamente menos acessível ao ataque nucleofílico. Já a melhor atividade do composto LS01 em relação aos compostos LS02 e LS03 pode ser justificada pela presença da subestrutura carbonílica  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada presente no éster conjugado ao carbono 8.

Para as LS classificadas como lindenanolídeos (LS06 e LS07), tem-se a estrutura química diferenciada dos germacranolídeos basicamente pela lactonização que ocorre entre os carbonos 6 e 7. Os compostos LS06 e LS07 ainda apresentam a introdução de sistemas cíclicos adicionais que parecem contribuir para a atividade

antimicobacteriana, visto que a introdução de sistemas cíclicos tende a aumentar a complexidade e estabilidade da molécula, reduzindo a formação de análogos. No entanto, a adição deste sistema cíclico adicional pode aumentar o caráter lipofílico da molécula, como é o caso do composto LS06, fato que justificaria a toxicidade desde composto em fibroblastos humanos MRC5.

As LS avaliadas neste trabalho ainda não haviam sido testadas quanto à atividade antimicobacteriana, mas algumas já tiveram outras atividades biológicas reportadas. LS01 já teve seu efeito antileucêmico comprovado (HERZ; GROOTE, 1977). Alarcon e colaboradores (1992) relataram a atividade antitumoral de LS04, enquanto Céspedes e colaboradores (2010) relataram seu efeito antiinflamatório. Já LS05 é uma estrutura inédita na literatura.

Nenhum dos extratos e compostos estudados neste trabalho apresentou atividade frente às micobactérias não-tuberculosas (MNT) *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium fortuitum*. Apesar da grande quantidade de trabalhos acerca da atividade de produtos naturais frente a *M. tuberculosis*, extratos e compostos são testados com menor frequência frente a MNT. Observou-se que nesses estudos a atividade encontrada frente às MNT é, geralmente, inferior à obtida para *M. tuberculosis* (McCUTCHEON et al., 1997; FISHER et al., 1998; LUNA-HERRERA et al., 2007; McGAW et al., 2008b; RAMOS et al., 2008; BOLIGON et al., 2012). Por exemplo, em trabalho de Ramos e colaboradores (2008), foram estudados 36 extratos brutos de plantas provenientes da Mata Atlântica brasileira. Enquanto cinco desses extratos apresentaram atividade frente a *M. tuberculosis*, com valores de MIC variando de <0,20 µg/mL a 3,12 µg/mL, somente três apresentaram atividade frente a *Mycobacterium kansasii*, com MIC de 100 µg/mL. Já em estudo de Luna-Herrera e colaboradores (2007), LS isoladas de *Laurus* spp. apresentaram MIC entre 6,25 e 50 µg/mL frente a *M. tuberculosis* H37Rv e não apresentaram atividade frente a *M. avium*. Sabe-se que grande parte das MNT é naturalmente resistente aos fármacos utilizados no tratamento da TB. Apesar disso, segundo Griffith e colaboradores (2007), há esperanças de que novos fármacos encontrados para o tratamento da TB possam também ser úteis para o tratamento das MNT. Com o crescimento da identificação do número de casos de micobacterioses, a necessidade de novos fármacos é considerada urgente, a fim de reduzir o tempo de tratamento, promover terapias mais efetivas e reduzir os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados atualmente (GRIFFITH et al., 2007; van INGEN et al., 2012).

O índice de seletividade (SI) é utilizado para estimar a janela terapêutica dos fármacos e identificar candidatos para estudos posteriores. De acordo com Orme (2001), Protopopova e colaboradores (2005) e García e colaboradores (2012), um bom candidato a fármaco deve apresentar  $SI \geq 10$ . Os valores de  $IC_{50}$  das LS estudadas neste trabalho frente a células de linhagem MRC5 variaram entre 22,18  $\mu\text{g/mL}$  e 125,3  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto o SI variou entre 1,77 e 11,88. Entretanto, somente o composto LS01 apresentou  $SI > 10$ . Isto justifica sua escolha em preferência aos demais compostos para a realização de alguns dos testes realizados neste trabalho, visto que foi aquele que apresentou maior seletividade para *M. tuberculosis* em relação às células humanas. Diversos estudos indicam que as LS podem ter elevada citotoxicidade (SCHMIDT, 1999), entretanto poucos trabalhos acerca da atividade antimicrobiana avaliam a seletividade destes compostos. LS isoladas de *Chamchaya calcarea*, apesar dos baixos valores de MIC, apresentaram valores de  $IC_{50}$  entre 0,2 e 25,7  $\mu\text{g/mL}$ , quando testadas frente à linhagem celular Vero, e SI entre 0,02 e 4,06, o que indica baixa seletividade para *M. tuberculosis*, inferior à encontrada neste trabalho (VONGVANICH et al., 2006). Já LS isoladas de *Ambrosia confertiflora* apresentaram valores mais altos de MIC (entre 64  $\mu\text{g/mL}$  e 128  $\mu\text{g/mL}$ ) e SI entre 0,06 e 0,5 (CORONADO-ACEVES et al., 2016).

Acredita-se que a nanotecnologia ofereça alternativas para contornar os problemas de toxicidade no tratamento da TB: a utilização de nanopartículas ( $< 1\mu\text{m}$ ) pode levar a uma ação mais específica dos fármacos e compostos carregados, aumentando sua eficácia terapêutica e reduzindo sua toxicidade. Sistemas capazes de liberar os antimicrobianos seletivamente dentro dos macrófagos podem melhorar consideravelmente o índice terapêutico dos fármacos, permitindo atingir maiores concentrações destes exatamente no local de multiplicação de *M. tuberculosis*, entretanto sem expor o paciente a altas concentrações sistêmicas que levam aos efeitos tóxicos (CLEMENS et al., 2012; BANYAL et al., 2013). Como células fagocíticas internalizam partículas de forma mais eficiente em comparação com outras células do hospedeiro, a encapsulação de fármacos anti-TB com nanopartículas oferece um mecanismo de direcionamento específico para as células infectadas por *M. tuberculosis*. Ainda, estudos demonstraram que as nanopartículas são internalizadas por macrófagos do sistema reticuloendotelial e são acumuladas no fígado, baço e pulmão, o que as torna adequadas para o tratamento da TB (GASPAR et al., 2008; HE et al., 2011; CLEMENS et al., 2012). Vibe e colaboradores (2015) demonstraram que, após a encapsulação de tioridazina, inibidor de

bombas de efluxo altamente tóxico testado em combinação com rifampicina, não foi mais detectada toxicidade do composto em modelos de infecção celular e de peixe zebra. Anisimova e colaboradores (2000) demonstraram que a nanoencapsulação de isoniazida (INH), estreptomicina e rifampicina (RMP) foi capaz de aumentar o acúmulo intracelular dos fármacos e reduzir a MIC de INH e estreptomicina em 3 a 4 vezes, em comparação aos fármacos não encapsulados. Já Kisich e colaboradores (2007) demonstraram a redução da MIC de moxifloxacino em 10 vezes após a encapsulação. Ao nanoencapsular INH, RMP e pirazinamida, Sharma, Sharma e Khuller (2004) demonstraram que as concentrações terapêuticas dos fármacos foram mantidas por 9 a 11 dias nos tecidos, em comparação com 12 a 24 horas dos fármacos livres. Assim, além da liberação direcionada, a encapsulação de fármacos com nanopartículas é considerada promissora no tratamento da TB devido à sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade dos fármacos no local da infecção e promover liberação sustentada, reduzindo a frequência na administração dos fármacos. Ainda, a nanoencapsulação pode permitir a incorporação de fármacos com diferentes níveis de polaridade, protegê-los da degradação ou modificações antes da chegada no sítio de ação e viabilizar a exploração de outras vias de administração, como a inalatória (GELPERINA et al., 2005; GRIFFITHS et al., 2010; COSTA et al., 2016). No caso das LS avaliadas neste trabalho, estudos de nanoencapsulação poderiam ser uma alternativa para aumentar a seletividade destes compostos através do direcionamento às células infectadas, reduzindo assim os riscos de toxicidade.

Estudos utilizando uma ampla faixa de concentrações dos fármacos e avaliando a atividade antimicrobacteriana ao longo do tempo, ao invés de ensaios de ponto final, permitem melhor compreensão da capacidade dos fármacos em diversas concentrações, contribuindo para um melhor entendimento da cinética bactericida e da emergência de resistência aos mesmos. Para o tratamento da TB, fármacos ideais devem exibir rápidas e altas taxas bactericidas, resultando em uma rápida redução da carga bacteriana e, assim, minimizando os riscos de disseminação da doença e desenvolvimento de resistência (STEENWINKEL et al., 2010). As quatro LS avaliadas quanto à cinética de morte apresentaram atividades concentração e tempo dependentes, além de apresentar rápida atividade bactericida, com exceção de LS05. Destaca-se a atividade de LS06, que reduziu a carga bacteriana a zero em todas as concentrações bactericidas. Ao contrário da INH, as LS não apresentaram desenvolvimento de resistência após o

início da redução da carga bacteriana, com exceção de LS07 em concentração 2xMIC. Em estudo avaliando a cinética bactericida de INH, RMP, etambutol e amicacina, Steenwinkel e colaboradores (2010) demonstraram que a INH apresentou rápida e alta capacidade bactericida, mas devido à emergência de resistência, não foi capaz de reduzir a carga bacteriana a zero, assim como observado para este fármaco no presente estudo. Os autores ainda indicam que a resistência à INH foi predominantemente fenotípica, causada principalmente por bombas de efluxo. De forma diferente, a RMP apresentou atividade bactericida relativamente lenta e tempo-dependente, mas foi capaz de reduzir a carga bacteriana a zero. Já o etambutol apresentou somente atividade bacteriostática, enquanto a amicacina apresentou altas e rápidas taxas bactericidas, não-dependentes da concentração, e foi capaz de matar todas as bactérias do inóculo. Em estudo semelhante, Dhillon e colaboradores (2010) demonstraram que a bedaquilina, fármaco recentemente aprovado para o tratamento de cepas MDR, apresenta atividade bacteriostática durante os sete primeiros dias de tratamento, iniciando a partir daí sua atividade bactericida dose-dependente; a redução completa da carga bacteriana só foi observada a partir do 21º dia, em concentrações superiores a 16 µg/mL. Os resultados obtidos neste estudo indicam que as LS podem atuar como agentes bactericidas que levam a uma rápida redução na carga bacteriana, de forma semelhante à INH, sem a desvantagem de desenvolvimento de resistência, como a RMP. Como exemplo de LS, pode-se citar a artemisinina e seus derivados, considerados os fármacos mais potentes para o tratamento da malária e responsáveis por reduzir rapidamente a carga parasitária em pacientes infectados por *Plasmodium sp.* Estes fármacos são capazes de matar os parasitas dentro de minutos e reduzir significativamente a carga parasitária em pacientes em 3 dias, além de apresentar baixas taxas de desenvolvimento de resistência (CUI; SU, 2009; MUHINDO et al., 2014). Caso a rápida atividade das LS seja uma característica em comum, isto pode sugerir também que tenham mecanismos de ação semelhantes e em diferentes organismos.

Considerando-se o atual cenário mundial de resistência aos fármacos utilizados no tratamento TB, é essencial que candidatos a novos fármacos apresentem atividade frente a isolados sensíveis e resistentes aos fármacos de primeira linha, principalmente MDR. Neste estudo, as LS apresentaram boa atividade frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis*, tanto sensíveis como resistentes. Pôde-se observar um aumento de 2 a 4 vezes (1 ou 2 diluições) na MIC dos compostos testados em isolados clínicos em relação à MIC obtida frente à cepa

padrão *M. tuberculosis* H37Rv. Resultados semelhantes foram observados em estudos que testaram extratos e compostos isolados de outras classes químicas frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* (JIMENEZ-ARELLANES et al., 2003; GEMECHU et al., 2013; MEHTA et al., 2013). Destaca-se que as MIC dos compostos testados frente a isolados resistentes à INH e isolados MDR foram equivalentes às aquelas obtidas para as amostras sensíveis, indicando que não há resistência cruzada entre as LS e os fármacos de primeira linha e que as LS têm potencial para uso em cepas resistentes. Luna-Herrera e colaboradores (2007) também demonstraram que não houve diferença entre as MIC de LS isoladas de *Laurus spp* frente a cepas sensíveis e resistentes a INH, RMP e etambutol. Considerando o interesse no mecanismo de ação destes compostos, ainda pode-se dizer que a atividade frente a cepas resistentes a INH e RMP indica que as LS possuem mecanismo de ação diferente destes fármacos.

Visto que o tratamento da TB é baseado em poliquimioterapia, é importante verificar se os candidatos a novos fármacos apresentam algum tipo de influência na atividade daqueles com os quais poderão ser combinados. Apesar de ser desejável a obtenção de ação sinérgica entre dois fármacos, o fator mais importante na busca por novas alternativas para o tratamento da TB é que não haja antagonismo com os fármacos de primeira linha (ZUMLA, NAHID; COLE, 2013). Quando testadas em combinação com INH ou RMP, as LS avaliadas neste estudo apresentaram valores do Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) que indicam que, quando em combinação, não influenciam na atividade destes fármacos e vice-versa. Ou seja, não há sinergismo, aditivismo ou antagonismo nestas combinações. A atividade em sinergismo com outros fármacos seria outra alternativa para o problema de toxicidade das LS, visto que, em combinação, seriam necessárias concentrações menores destes compostos para obtenção de atividade antimicrobiana mais potente e com menor toxicidade, quando comparada às concentrações necessárias para sua ação quando utilizadas individualmente. Estudos já demonstraram atividade sinérgica de LS com diversos tipos de compostos e fármacos em diversas atividades, como antitumoral, em combinação com cisplatina e paclitaxel, frente a células de linhagem de carcinoma de ovário (van HAAFTEN et al., 2015); antimalária, em combinação com mefloquina e quinina (GUPTA et al., 2002); tripanocida, em combinação com benzonidazol e nifurtimox, fármacos utilizados para o tratamento da Doença de Chagas (JIMENEZ et al., 2014); antimicrobiana, em combinação com oxacilina e gentamicina, frente a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*

(CARTAGENA et al., 2015). Neste último estudo, as LS apresentaram sinergismo em combinação com um fármaco inibidor da síntese da parede celular (oxacilina). Agarwal e colaboradores (2015) demonstraram a atividade sinérgica de artemisinina com análogos de fluoroquinolonas frente a *Plasmodium falciparum*. Visto que fluoroquinolonas são utilizadas no tratamento de TB-MDR, seu sinergismo em combinação com LS frente a *M. tuberculosis* poderia ser verificado e explorado. Luna-Herrera e colaboradores (2007) relataram a atividade sinérgica entre si de duas LS isoladas de *Laurum spp.* Aliar LS que apresentaram atividades antimicobacterianas significativas pode ser uma alternativa para reduzir seu efeito tóxico, caso as concentrações necessárias de cada uma seja consideravelmente menor em relação à utilizada individualmente. Salla e colaboradores (2013) também já demonstraram o efeito sinérgico de LS entre si, frente a células de linhagem de câncer de cólon humano.

O principal desafio na redução dos longos períodos de tratamento da TB é a presença de subpopulações de bacilos persistentes nas lesões pulmonares, que atuam como reservatórios durante o período de latência e podem ser responsáveis por casos de recidiva da doença. *M. tuberculosis* tem a capacidade de se adaptar às condições microambientais desfavoráveis nas lesões causadas pela TB, como depleção de oxigênio e nutrientes, entrando em um estado não-replicativo que confere tolerância ou resistência fenotípica a diversos antimicrobianos (LEVIN; ROZEN, 2006; WARNER; MIZRAHI, 2006). O completo controle da TB necessita de fármacos que sejam efetivos frente a esses bacilos. Modelos *in vitro* utilizando depleção de oxigênio (Modelo de Wayne) e depleção de nutrientes (Modelo de Loebel) demonstraram que *M. tuberculosis* é capaz de sobreviver por longos períodos em estado não-replicativo e apresentar tolerância aos fármacos através da redução nos aparatos de transcrição gênica, biossíntese de lipídeos, divisão celular e respiração celular (BETTS et al., 2002; GENGENBACHER et al., 2010). Neste estudo, foi utilizado o Modelo de Loebel para avaliação das LS frente aos bacilos em estado não-replicativo. Enquanto LS01 e LS05 não foram ativas, LS06 apresentou atividade bactericida em concentrações correspondentes a 4xMIC e 8xMIC, enquanto LS07 foi ativa em concentrações correspondentes a 8xMIC. Em comparação, INH e RMP foram ativas frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo somente em concentrações a partir de 200xMIC e 25.000xMIC, respectivamente. Assim, os resultados sugerem que LS06 e LS07 têm boa atividade frente a *M.*

*tuberculosis* em estado não-replicativo, podendo atuar como agentes esterilizantes das lesões pulmonares que contêm esses bacilos.

A tolerância de *M. tuberculosis* em estado não-replicativo a INH e RMP pode ser explicada com base no mecanismo de ação destes dois fármacos: enquanto a INH atua como inibidor da síntese de ácidos micólicos, a RMP atua inibindo a síntese de RNA (KOLYVA; KARAKOUSIS, 2012). Como ambas as atividades estão reduzidas consideravelmente nos bacilos persistentes, os bacilos tornam-se tolerantes a estes fármacos. Em contraste, a bedaquilina, fármaco recentemente introduzido no tratamento da TB-MDR, é capaz de agir em bacilos persistentes, com MIC semelhante àquela determinada para *M. tuberculosis* em fase exponencial de crescimento. Sua atividade dá-se pela inibição da enzima ATP-sintetase, essencial para a sobrevivência de *M. tuberculosis* mesmo em estado de latência, o que explica sua atividade nesta subpopulação de bacilos (ANDRIES et al., 2005; KOUL et al., 2008). Com base nessas explicações, os resultados obtidos com o tratamento de *M. tuberculosis* em estado não-replicativo com LS06 e LS07 indicam que estes compostos atuam em alvos essenciais para a sobrevivência de *M. tuberculosis*, mesmo em estado de latência.

De acordo com estudo conduzido por Gengenbacher e colaboradores (2010), os bacilos em estado não-replicativo gerados pelo Modelo de Loebel (depleção de nutrientes) são mais tolerantes aos fármacos em comparação com aqueles gerados pelo Modelo de Wayne (depleção de oxigênio). Por exemplo, enquanto as concentrações necessárias de RMP frente aos bacilos gerados pelo Modelo de Wayne correspondem a 50xMIC, em Modelo de Loebel a concentração necessária corresponde a 2.500xMIC. Já a bedaquilina, que em Modelo de Wayne necessita de concentrações correspondentes à MIC, em Modelo de Loebel necessita de concentrações 20xMIC. Isto sugere que as concentrações necessárias de LS06 e LS07 frente a esses bacilos podem ser inferiores se estes compostos forem testados em Modelo de Wayne, o que pode ser importante para comparação com outros fármacos, visto que o Modelo de Wayne é mais comumente utilizado. Ainda, é possível que LS01 e LS05 também apresentem atividade.

A demonstração da atividade intracelular das LS e em estrutura granuloma-like torna-se particularmente importante, visto que estes compostos são não só capazes de agir frente a bacilos em estado de latência, mas também são capazes de atingir o local em que eles se encontram.

Os compostos LS01, LS06 e LS07 também apresentaram atividade em modelo de infecção de macrófagos, demonstrando não

somente ser capazes de atravessar a membrana celular, mas também de atingir e atuar na população bacteriana presente no interior da célula. Concentrações superiores à MIC foram associadas à morte celular devido à toxicidade destes compostos, enquanto concentrações inferiores à MIC não apresentaram proteção às células infectadas nem redução da carga bacteriana. Já em concentração correspondente à MIC, os compostos apresentaram capacidade de proteção das células, além de redução na contagem bacteriana. Assim, células infectadas tratadas com a MIC dos compostos permaneceram viáveis e com redução na carga bacteriana, enquanto em células não tratadas, as bactérias continuaram a se multiplicar, levando à morte celular, rompimento da membrana celular e liberação das bactérias ao meio externo. Na curva de tempo de morte das LS, observou-se que as concentrações correspondentes à MIC apresentaram somente atividade bacteriostática. Entretanto, neste modelo de infecção celular, essas concentrações foram capazes de reduzir a quantidade de bactérias viáveis. Isto pode estar associado ao estado de adaptação de *M. tuberculosis* à forma intracelular, diferente em comparação com seu estado na forma extracelular. Monahan e colaboradores (2001) demonstraram que *M. bovis* BCG expressa diversas proteínas quando na forma intracelular que não são expressas quando cultivadas na forma extracelular. Em estudo para avaliação da atividade intracelular da bedaquilina, Dhillon e colaboradores (2010) relataram que este fármaco, que em bactérias extracelulares apresenta uma fase bacteriostática de cerca de sete dias antes do início da atividade bactericida, inicia sua atividade bactericida na forma intracelular sem passar pela fase bacteriostática. Os autores associam a redução dos níveis de ATP bacteriano durante a infecção, o que faz com que o efeito inibição da enzima ATP sintetase seja mais rápido nessa população bacteriana. Considerando-se que os macrófagos, quando ativados, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) na tentativa de combater o bacilo (PIETERS, 2008), outro fator que pode estar associado à atividade intracelular é a produção de EROs também devido ao tratamento com as LS. Apesar de *M. tuberculosis* apresentar mecanismos que permitam resistir aos EROs gerados pelos macrófagos ativados, a adição de EROs produzidos após o tratamento com as LS pode ser a responsável pela morte do bacilo. Entretanto, não é possível afirmar que há sinergismo entre os macrófagos infectados e as LS, visto que em concentrações inferiores à MIC, as LS não foram capazes de proteger as células infectadas nem reduzir a carga bacteriana. Apesar da interrupção dos experimentos no terceiro dia, devido à perda de viabilidade celular, estudos relatam que períodos de 2 a 3 dias são

suficientes para a avaliação da atividade intracelular dos compostos (DHILLON; MITCHISON, 1992; CLEMENS et al., 2012; JIMÉNEZ-ARELANES et al., 2013). Modelos utilizando células de linhagem J774, derivadas de macrófagos murinos, sem a necessidade de ativação com PMA, parecem mais estáveis (DHILLON et al., 2010).

LS01 também apresentou redução estatisticamente significativa no número de UFC após tratamento de estrutura *granuloma-like*, na concentração 100  $\mu$ M. Dada a complexidade da estrutura do granuloma, deve-se considerar as dificuldades que os fármacos podem ter para atravessar esta barreira (FLYNN; CHAN; LIN, 2011). Os resultados obtidos mostram que o composto foi capaz de atravessar essa estrutura e atingir os bacilos em concentração suficiente para exercer sua atividade. Em conjunto com a demonstração da atividade intracelular das LS, estes dados tornam-se particularmente importantes visto que as LS testadas demonstraram não só ser capazes de agir frente a bacilos em estado de latência, mas também de atingir *in vitro* o local em que eles se encontram.

As predições *in silico* mostraram que as LS estudadas neste trabalho não violam as Regras dos Cinco de Lipinski. Isto indica que esses compostos têm características “*drug-like*” e podem apresentar boa biodisponibilidade oral, com alta capacidade de absorção e permeabilidade, o que corrobora a ideia da administração oral (LIPINSKI, 2004). Observou-se que os compostos têm valores de LogP, peso molecular, aceptores de ligação hidrogênio (AH), doadores de ligação hidrogênio (DH), ligações rotacionáveis, volume e área de superfície polar (ASP), muito semelhantes entre si. Observou-se também que LS06, em relação a esses parâmetros, se distingue um pouco do restante do grupo e se assemelha mais à artemisinina (LS utilizada clinicamente para o tratamento da malária), apresentando maior LogP e menor ASP e números de AH, DH e ligações rotacionáveis em comparação aos demais. A utilização da artemisinina, da INH e da RMP nestas predições *in silico* pode ser interessante para comparação dos compostos com fármacos que são usados clinicamente.

Os valores de LogP, que indicam a lipofilicidade das moléculas, têm um importante papel quando se trata da atividade frente a *M. tuberculosis*. Valores moderados de lipofilicidade parecem estar envolvidos com a atividade antimicobacteriana, uma vez que a composição química da parede da micobactéria é altamente lipofílica, o que pode impedir a entrada de compostos muito hidrofóbicos e retardar o transporte de compostos polares através da camada lipídica externa (CONNEL; NIKAIDO, 1994). Como descrito na tabela 6, os compostos

avaliados parecem apresentar esta desejada lipofilicidade moderada, uma vez que a variação dos valores de LogP parece não influenciar diretamente nos valores de MIC encontrados. O composto LS06 (LogP = 2,29), o mais lipofílico, apresentou atividade antimicobacteriana semelhante ao composto LS07 (LogP = 0,62), o segundo mais polar. A lipofilicidade necessária para atravessar a parede micobacteriana também pode explicar a ausência de atividade antimicobacteriana das frações aquosas dos extratos testados, uma vez que nesta fração são encontrados compostos com menor lipofilicidade.

Enquanto as LS não apresentaram violações às Regras de Lipinski, observou-se que a RMP, fármaco já utilizado no tratamento da TB, apresentou três violações. É comum que candidatos a fármacos sejam avaliados através da Regra dos Cinco de Lipinski após triagem ou para composição de bibliotecas de compostos. Geralmente, é estabelecido um limite de uma ou duas violações na Regra dos Cinco de Lipinski para que um fármaco seja aceito para seguimento dos estudos. Agentes antibacterianos, entretanto, devido ao seu alto peso molecular e polaridade, têm sido considerados exceções a essa regra. As diferentes composições da membrana celular humana e da parede celular bacteriana sugerem que são necessárias diferentes propriedades físico-químicas para que haja penetração dos fármacos nestas estruturas. Ainda, enquanto as características dos fármacos capazes de agir em bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas parecem diferir significativamente, especialmente quanto ao peso molecular e polaridade, os fármacos com atividade antimicobacteriana parecem ter características físico-químicas bem variadas (O'SHEA; MOSER, 2008; KOUL et al., 2011). Por isso, as bibliotecas de compostos para triagem frente a *M. tuberculosis* devem ser, segundo Koul e colaboradores (2011), pouco restritivas e bastante diversificadas. Em estudo avaliando as propriedade físico-químicas dos 39 fármacos utilizados para o tratamento da TB, incluindo aqueles em estudo clínico, Dashti, Grkovic e Quinn (2014) demonstraram que 23% (9 fármacos) apresentaram duas ou mais violações das Regras de Lipinski; destes, 5 são injetáveis, 3 estão em estudo clínico e o outro é a RMP. Os autores também relataram uma grande variação nas propriedades físico-químicas, mas observaram diferenças no padrão de moléculas sintéticas em relação às de origem natural: enquanto fármacos de origem sintética apresentaram LogP entre -1 e 1 e peso molecular inferior a 200 Da, produtos de origem natural apresentaram, em sua maioria, maiores valores para ambos os parâmetros. Em comparação, o LogP dos compostos

estudados no presente trabalho variou entre 0,28 e 2,29, com maioria superior a 1, enquanto o peso molecular variou entre 244 e 396.

As propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) preditas *in silico* também são muito semelhantes para todas as LS avaliadas neste estudo. Apesar das boas taxas de absorção e permeação, as predições indicam que as LS estudadas neste trabalho podem apresentar altas taxas de ligação a proteínas plasmáticas (PPP), principalmente à albumina. Isto indica que uma baixa porcentagem dos fármacos estará na forma livre, dificultando a distribuição e liberação destes compostos para os tecidos. Observou-se que artemisinina e RMP, utilizadas clinicamente, apresentaram valores preditos semelhantes aos obtidos para as LS. Entretanto, deve-se considerar que as predições *in silico* podem ter graus diferentes de confiabilidade, principalmente para moléculas que não são usuais, e que não substituem estudos *in vitro* e *in vivo*. Algumas LS tiveram suas características farmacocinéticas estudadas *in vitro* e/ou *in vivo*. Em estudo realizado para avaliar a biodisponibilidade e a captação da LS partenólídeo utilizando-se modelo de células Caco-2, demonstrou-se que essa LS apresenta significativo transporte pelas células de intestino humano, predominantemente por via passiva, assim como predito para as LS do presente estudo (KHAN et al., 2003). Em avaliação da ligação de quatro LS às proteínas plasmáticas, Wagner, Krat e Merfort (2004) relataram que houve uma grande variação, entre 30% e 50% entre as LS estudadas, valores inferiores aos preditos para as LS do presente estudo. Isto indica que alterações nas moléculas também podem ser úteis para que tenham reduzida capacidade de se ligar às proteínas plasmáticas. Altas taxas de ligação a proteínas plasmáticas podem estar associadas à reação da carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada com o grupo tiol presente na cisteína da posição 14 da albumina. Entretanto, os autores demonstraram que menos de 6% das LS se ligaram ao aminoácido desta posição na albumina, em um período de 60 minutos. Por isso, a ligação a outros aminoácidos, assim como interações não-covalentes, devem ser consideradas em relação à ligação das LS às proteínas plasmáticas.

As predições *in silico* também indicam que as LS podem sofrer significativo metabolismo de primeira passagem (MPP), assim como a artemisinina, principal motivo pelo qual sua biodisponibilidade por via oral (BO) predita é inferior a 30%. A artemisinina apresenta, de fato, baixo tempo de meia-vida *in vivo*, de cerca de 2 horas. Alterações nas moléculas de LS podem resultar em maiores tempos de meia-vida. Em estudo de Zhang e colaboradores (2012), foi demonstrado que a otimização da LS partenólídeo em micheliólídeo foi capaz de aumentar

o tempo de meia vida de 0,34 horas para 2,64 horas, sem perdas na atividade. Ainda, transformando esses compostos em pró-fármacos, a meia-vida do partenolídeo passou para 2,5 horas, enquanto o tempo de meia-vida do micheliolídeo passou para 8 horas. O pró-fármaco de partenolídeo encontra-se atualmente em estudos clínicos de fase I quanto à atividade antitumoral. Já Isacchi e colaboradores (2011) demonstraram que o uso de nanopartículas também pode ser útil para enfrentar os problemas de metabolização: o tempo de meia-vida da artemisinina foi aumentado para 3 e 24 horas com a utilização de dois tipos de formulações de lipossomas.

Os resultados obtidos nas predições *in silico* também indicam que as LS estudadas neste trabalho possam pertencer à mesma categoria de risco de toxicidade que RMP e INH. Apesar disso, os estudos *in vitro* realizados neste trabalho indicam que essas moléculas têm seletividade inferior para micobactérias em relação aos fármacos utilizados clinicamente no tratamento da TB, devido às suas maiores MIC em relação a eles. Assim, a utilização de maiores concentrações dos compostos para obtenção da atividade antimicobacteriana aumenta os riscos de toxicidade.

A alteração das moléculas para obtenção de derivados pode ser uma alternativa para a realização de melhorias nas propriedades farmacocinéticas, potencialização da atividade desejada ou redução da toxicidade de compostos. Para isso, o conhecimento da molécula e estudos de relação estrutura-atividade são essenciais para que as características responsáveis pela atividade sejam mantidas. O alinhamento das moléculas permite que a posição de estruturas presentes nas moléculas, de acordo com o tipo de interação com o sítio ativo do seu alvo, seja comparada. Em conjunto com a análise da atividade das moléculas, o alinhamento permite também a identificação de farmacóforos, ou seja, estruturas responsáveis pela atividade avaliada. Como mencionado anteriormente, o exociclo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona é tido como presença essencial para a atividade frente a *M. tuberculosis*; no entanto, a simples presença deste anel não garante a atividade contra o bacilo (FISCHER et al., 1998). Por isso, o alinhamento das moléculas foi realizado priorizando-se essa estrutura. Dentre os diversos resultados de alinhamento obtidos englobando todas as sete moléculas de LS, nenhum foi capaz de alinhar o anel lactônico de todas. Entretanto, um deles foi capaz de alinhar o anel lactônico de seis moléculas, com exceção de LS05. Isto pode ter ocorrido devido à maior rigidez na angulação da ligação do anel lactônico ao restante do esqueleto carbônico neste composto. No caso das seis moléculas alinhadas, os

dois oxigênios aceptores de ligação hidrogênio (AH) do anel lactônico foram os responsáveis pelo alinhamento. Observou-se que as moléculas mais semelhantes entre si e que apresentaram melhor *score* de alinhamento (LS01, LS02 e LS03) apresentam nove regiões hidrofóbicas e seis AH alinhados, incluindo os dois do anel lactônico. Isto significa que estas regiões alinhadas fazem interações semelhantes com o sítio ativo, devido à sua posição (ou seja, as distâncias em relação ao sítio ativo são semelhantes) e ao tipo de ligação: regiões hidrofóbicas fazem interações hidrofóbicas, enquanto AH fazem interações de hidrogênio. Apesar de terem várias partes de suas moléculas alinhadas, essas três moléculas não têm a mesma potência frente a *M. tuberculosis*: enquanto LS01 apresenta MIC de 6,25 µg/mL, LS02 e LS03 têm MIC = 25 µg/mL. Essa diferença na potência de moléculas estruturalmente semelhantes pode indicar que nem todas as estruturas em comum têm o mesmo grau de importância para a atividade antimicobacteriana. Quando as LS com melhor atividade frente a *M. tuberculosis* foram alinhadas (LS01, LS06 e LS07), observou-se que estas moléculas compartilham um terceiro AH alinhado em comum, além dos dois AH do anel lactônico, e somente uma região hidrofóbica. Isto indica que este terceiro AH, nesta posição, pode ser importante para a melhoria da atividade antimicobacteriana. Ou seja, este AH, nesta posição, pode ser capaz de fazer interações de hidrogênio com o sítio ativo, o que pode ser importante para a atividade antimicobacteriana; caso o AH encontre-se em posições diferentes, esta interação pode não ocorrer, devido à maior distância ao seu ponto de interação, por exemplo. Já o alinhamento das regiões hidrofóbicas parece ter menor importância neste caso, visto que somente uma região hidrofóbica foi alinhada entre as LS mais ativas. Apesar de não terem sido alinhadas, as regiões hidrofóbicas destas moléculas também atuam na interação com o sítio ativo. Entretanto, como as interações hidrofóbicas ocorrem através de solvatação por camadas de moléculas de água, a posição dessas regiões parece ter menos importância na ligação de fármacos ao sítio ativo em relação às estruturas capazes de fazer interações de hidrogênio. Com base nesses resultados, caso alterações nas moléculas LS02, LS03, LS04 e LS05 pudessem ser feitas, a adição de um AH que pudesse ser alinhado com o terceiro AH descrito para LS01, LS06 e LS07, poderia ser realizada na tentativa de melhorar sua atividade antimicobacteriana.

Embora as LS estudadas não apresentem atividade com potência comparável à INH e à RMP, características como sua rápida atividade, capacidade de atuar em *M. tuberculosis* em estado não-replicativo e em bacilos intracelulares, aliadas à necessidade de

fármacos que atuem por diferentes mecanismos de ação, justificam o estudo do seu mecanismo de ação.

O perfil de expressão gênica de *M. tuberculosis* após o tratamento com LS 01, LS06 e LS07 foi muito semelhante. Em comparação, após tratamento com podoandina (POD), LS que não apresenta atividade antimicobacteriana e é estruturalmente semelhante às demais, a expressão de poucos genes foi alterada. Este composto foi utilizado como controle, para que genes que não fossem importantes para a atividade antimicobacteriana pudessem ser excluídos da análise final. Entretanto, isso não foi necessário, já que somente 19 genes tiveram sua expressão alterada com POD, comparado com 121, 302 e 513 genes alterados após o tratamento com LS01, LS06 e LS07, respectivamente.

A análise do perfil transcricional dos genes categorizados por função revelou que o tratamento com as três LS avaliadas levou a um mesmo padrão na alteração da expressão gênica, havendo predomínio de genes pertencentes às categorias metabolismo intermediário e respiração, proteínas hipotéticas conservadas e proteínas regulatórias entre os genes superexpressos, enquanto os genes supraexpressos estavam bem distribuídos entre as categorias parede celular e processos celulares, proteínas hipotéticas conservadas, metabolismo intermediário e respiração, família PE/PPE e proteínas de função desconhecida. Dado o predomínio de genes envolvidos em metabolismo intermediário e respiração dentre os genes superexpressos, esta primeira análise sugere que as LS avaliadas não apresentam mecanismo de ação semelhante à maioria dos fármacos utilizados no tratamento da TB, que agem principalmente inibindo a síntese de parede celular.

Os perfis de alteração na expressão gênica semelhantes e a grande quantidade de genes alterados em comum, além de resultados semelhantes na análise de probabilidade hipergeométrica, permitiram que os resultados obtidos no *microarray* para LS01, LS06 e LS07 pudessem ser analisados em conjunto.

De forma geral, a avaliação dos genes supraexpressos revela uma resposta inespecífica, que parece estar relacionada a uma redução geral no crescimento bacteriano. Resposta semelhante foi relatada por Voskuil e colaboradores (2011), ao avaliar a resposta de *M. tuberculosis* a EROs e espécies reativas de nitrogênio. Os genes necessários para o crescimento bacteriano têm papel central em diversas rotas metabólicas e biossintéticas, incluindo aquelas necessárias para a síntese de aminoácidos, ácidos nucléicos e cofatores, além de processos celulares centrais, como replicação, transcrição, síntese protéica e divisão celular

(SASSETTI; BOYD; RUBIN, 2003). Dentre os genes supraexpressos, grande parte está relacionada com funções diversificadas de manutenção celular, assim como observado na análise por categorias de função. Pode-se destacar, entretanto, a supraexpressão de genes envolvidos diretamente com a fase de crescimento exponencial de *M. tuberculosis*, como por exemplo, os pertencentes ao *cluster mbt* (*mbtA*, *mbtB*, *mbtC*, *mbtD*, *mbtE*, *mbtF*, *mbtG*, *mbtH*, *mbtI*), envolvido na síntese do agente sideróforo micobactina, essencial para o crescimento bacteriano, e o gene *rpfC*, conhecido como fator promotor de ressuscitação (do inglês, *resuscitation-promoting factor*), associado com o crescimento de *M. tuberculosis* e à estimulação do crescimento exponencial em bactérias em fase de latência (DOWNING et al., 2004; CHAVADI et al., 2011).

A resposta de *M. tuberculosis* após o tratamento com as LS pode ser melhor entendida avaliando-se os genes superexpressos. De acordo com a análise de probabilidade hipergeométrica, o perfil de alteração na expressão gênica obtido com o tratamento com as LS assemelha-se ao perfil de resposta ao stress oxidativo por EROs. *M. tuberculosis* utiliza uma série de mecanismos de defesa contra EROS e espécies reativas de nitrogênio, o que é vital para a manutenção celular e também para a sobrevivência no interior dos macrófagos (EHRT; SCHNAPPINGER, 2009). A expressão dos principais genes envolvidos na resposta às LS é controlada pelo fator sigma H, fator de transcrição global codificado pelo gene *sigH*, previamente associado com a resposta ao *stress* oxidativo e que apresentou superexpressão após o tratamento com as LS (MANGANELLI et al., 2002). Dentre os genes superexpressos, destacam-se diferentes grupos: *hsp* e *clpB*, que codificam proteínas do tipo *heat shock* e estão comumente associados à resposta ao *stress*; genes pertencentes ao *cluster arg* (*argB*, *argC*, *argD*, *argF*, *argG*, *argH*, *argJ* e *argR*), envolvido na biossíntese de arginina e também comumente associado à resposta ao *stress*; *katG*, que codifica a proteína catalase-peroxidase KatG, responsável pela degradação de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos; *trxA*, *trxB*, *trxB-2* e *thiX*, que codificam tioredoxinas; *cysA*, *cysK2*, *cysM*, *cysW*, *cysT*, responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas na biossíntese de cisteínas; *moeB* e *moaE1*, que codificam proteínas envolvidas na síntese de molibdopterina; *rmlB* e *rmlC*, que codificam proteínas envolvidas no metabolismo da glicose; e *rpiB*, que codifica proteína envolvida no metabolismo da ribose (MANGANELLI et al., 2002; SMITH, 2003; MEHRA; KAUSHAL, 2009; SHARP et al., 2016).

O estado redox dos grupos sulfrídila de resíduos de cisteína pode afetar a estrutura e a função de muitas proteínas. Geralmente, o ambiente intracelular encontra-se em estado de redução, mas EROs e outras moléculas com poder oxidativo podem alterar esse balanço redox (ASLUND; BECKWITH, 1999). Os sistemas tiorredoxina/tiorredoxina redutase e glutatona/glutatona redutase são comumente os principais sistemas implicados na regulação da homeostase redox em diversos organismos (GRANT, 2001). Actinobactérias, incluindo estreptomicetos e micobactérias, não produzem glutatona, mas sim micotiol (1-D-mio-inositol-2-(N-acetil-L-cisteinil) amino-2-deoxi-a-D glicopiranosídeo), tiol de baixo peso molecular que serve como reserva de cisteína e atua na detoxificação de agentes alquilantes, EROS e espécies reativas de nitrogênio e xenobióticos. Além disso, o micotiol também atua na manutenção do alto estado de redução do ambiente intracelular (NEWTON; BUCHMEIER; FAHEY, 2008). A indução de enzimas envolvidas na biossíntese de cisteína e no metabolismo da ribose e da glicose pode indicar um aumento na necessidade dos precursores da biossíntese do micotiol. Em estudo de Paget e colaboradores (2001), foi demonstrado que *Streptomyces coelicolor* contendo mutações no gene *sigR*, homólogo de *sigH* em micobactérias, tiveram sua produção de micotiol reduzida em quatro vezes em comparação às bactérias não mutadas. Ainda, a indução de genes envolvidos na síntese de molibdopterina, cofator contendo ditiois requerido por molibdoenzimas, também pode indicar a necessidade de grupamentos tiol pelas bactérias sob *stress* oxidativo (MANGANELLI et al., 2002).

A síntese de arginina pela bactéria costuma levar a um gasto energético maior em relação à aquisição deste aminoácido do meio externo. A indução do *cluster* de genes envolvidos na síntese de arginina pode estar envolvida na inabilidade de *M. tuberculosis* de captar arginina após exposição ao *stress* oxidativo. Além disso, a necessidade aumentada de processamento de proteínas pode estar relacionada aos danos causados às estruturas proteicas pelo *stress* oxidativo e à subsequente inabilidade das proteínas do tipo *heat shock* de recuperar completamente as estruturas das proteínas danificadas (MEHRA; KAUSHAL, 2009).

O perfil de transcrição obtido após o tratamento de *M. tuberculosis* com LS06 e LS07 é muito semelhante ao obtido por Manganelli e colaboradores (2002), ao avaliar perfil transcricional de *M. tuberculosis* após tratamento com diamida, um agente oxidante tiol-específico. No presente estudo, não foi observada a superexpressão de genes envolvidos no reparo do DNA, como *recA*, *radA* e *alkA*, em contraste com estudo de Voskuil e colaboradores (2011), ao avaliar a resposta de *M. tuberculosis* ao tratamento com peróxido de hidrogênio.

Também não foi observada superexpressão dos genes *sodA* e *sodC*, que codificam enzimas superóxido dismutase A e C, associadas à manutenção do balanço redox intracelular, e *ahpC*, que codifica a enzima alquil hidroperoxidase, comumente associadas à resposta ao *stress* oxidativo (SHERMAN et al., 1999; DUSSURGET et al., 2001).

De fato, a geração de EROs foi confirmada através de detecção de  $H_2O_2$ , após tratamento de *M. tuberculosis* com LS06 e LS07. O teste também demonstrou a geração de EROs em células de cultura, apesar de aparentemente em proporções menores, o que pode explicar a inespecificidade destes compostos e também sua citotoxicidade. Estudos demonstram que inibidores da síntese de micotiol apresentam atividade antimicobacteriana, inclusive frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo (NEWTON et al., 2011). Assim como no caso da inibição da síntese de micotiol, o desequilíbrio causado no balanço redox bacteriano pode, então, explicar atividade dos compostos LS06 e LS07 frente a *M. tuberculosis* em estado latente.

A atividade antimalária da artemisinina parece estar relacionada à geração de EROs. Apesar de pertencer à mesma classe química, esse fármaco difere das LS estudadas neste trabalho em dois pontos essenciais: o anel lactônico, composto por seis e não cinco átomos, e a presença de uma função peróxido. Esta função peróxido é considerada essencial para atividade frente à *Plasmodium spp.*, e a geração de EROs parece estar associada ao seu rompimento. Estudos sugerem que a artemisinina modula o *stress* oxidativo do parasita e reduz seus níveis de antioxidantes e glutatona. Entretanto, ainda não há consenso sobre a exata participação destes radicais livres no seu mecanismo de ação (MESHNICK, 2002; CUI; SU, 2009). Embora incerta na atividade antimalária da artemisinina, a geração de EROs já foi associada à atividade antitumoral de diversas LS (YANG et al., 2011; D'ANELO et al., 2013; SALLA et al., 2013; WANG et al., 2016). Yang e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento de células de câncer de ovário com a LS costunolídeo induziu a um aumento das EROs intracelulares. O papel destes radicais na atividade antitumoral foi comprovado através do pré-tratamento das células com o agente antioxidante N-acetil-L-cisteína, o que atenuou significativamente a produção de EROs por essa LS, assim como a ativação de caspases, a supraexpressão de Bcl-2 e a apoptose das células tratadas. Já em estudo de D'Anele e colaboradores (2013), foi demonstrado que a LS partenolídeo estimulou a geração de EROs e células de câncer de mama logo nas primeiras horas de tratamento (1-3 horas). Segundo os autores, o fármaco induziu a produção de ânion superóxido pela ativação da enzima NADPH oxidase. A geração de EROs levou à depleção de grupamentos tiol e

glutationa, além da ativação da quinase JNK (do inglês, *c-Jun-N-terminal kinase*) e supraexpressão do fator nuclear kB (NF-kB). Ainda, Sülsen e colaboradores (2016) relataram a geração de EROs após tratamento de *Trypanosoma cruzi* com LS isolada de *Ambrosia tenuifolia*.

As atividades biológicas das LS também são atribuídas à carbonila  $\alpha,\beta$ - insaturada presente no exociclo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona das LS, que pode atuar como agente alquilante, reagindo facilmente com nucleófilos, através de reações do tipo Adição de Michael. Essas reações ocorrem normalmente com grupos sulfidrila presentes em resíduos de cisteína, que compõem diversas proteínas e a glutaciona, de forma covalente, e são indicadas com um mecanismo de ação geral das LS (SCHMIDT, 1999). O perfil transcricional de *M. tuberculosis* após tratamento com as LS avaliadas neste trabalho, além de se assemelhar com perfis de transcrição em resposta a EROs, também pode ser associado a esse mecanismo de ação geral da LS. Ao reagir com os grupos sulfidrila presentes em resíduos de cisteína, as LS podem se ligar a proteínas e causar inibição dessas moléculas, o que pode explicar a superexpressão dos genes envolvidos na biossíntese da cisteína. Visto que as ligações podem ocorrer de maneira inespecífica, este mecanismo também ajuda a entender a baixa seletividade destes compostos, além da alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas. Além disso, as LS podem se ligar aos grupos sulfidrila do micotiol, podendo causar a depleção dessas moléculas e alterar o balanço redox bacteriano. Assim, superexpressão dos genes que codificam cisteína e outros precursores da biossíntese de micotiol, tioredoxinas e molibdopterina podem ocorrer em resposta à alteração no sistema redox bacteriano, devido à ligação das LS ao micotiol. Visto que os compostos estudados neste trabalho apresentam seletividade, ainda que moderada, para micobactérias, isto pode indicar que a ligação das LS ao micotiol pode ter um efeito mais importante em micobactérias, do que sua ligação a outras proteínas em células de cultura. Como o micotiol é uma molécula exclusiva das actinobactérias, esta molécula é considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da TB. Como mencionado anteriormente, os inibidores da síntese do micotiol apresentaram atividade antimicobacteriana, inclusive frente a *M. tuberculosis* em estado latente. No caso do presente trabalho, a depleção do micotiol também pode explicar a atividade das LS estudadas frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo. Essa atividade ainda pode ser explicada pela possibilidade de alquilação de qualquer proteína que seja essencial para a sobrevivência da bactérias no estado de latência.

Baseando-se no que foi discutido e na comprovação da geração de EROs pelas LS, existem pelo menos duas possibilidades: a ligação ao micotiol e a geração de EROs ocorrem de forma independente e atuam de forma conjunta frente ao bacilo; ou a ligação ao micotiol leva a um grande desequilíbrio no estado redox bacteriano, o que causa acúmulo de EROs. A opção de geração de EROs sem a ligação aos grupamentos sulfidríla do micotiol também existe, mas é menos provável. Dois estudos que avaliaram a atividade antitumoral da LS partenólídeo, sua capacidade de geração de EROs e seu mecanismo de ação, relataram conclusões diferentes entre si. Sun e colaboradores (2010) relatam que o partenólídeo atua de forma seletiva a enzima NADPH oxidase e medeia o *stress* oxidativo em células de câncer de próstata, tanto pelo aumento da produção de EROs quanto pela redução das defesas antioxidantes das células causada por esse aumento. Já Zhang, Ong e Shen (2004) descrevem que o partenólídeo depletou rapidamente os grupamentos tiol intracelulares, incluindo glutatona e proteínas contendo tiol em células de linhagem de câncer colorretal. Concomitantemente, foram observados aumentos de EROs intracelulares, de forma dose e tempo dependente.

Visto que as micobactérias têm um grande aparato de defesa contra EROs, a possibilidade de ligação ao micotiol parece ser mais importante para a atividade antimicobacteriana do que a geração de EROs: a inibição de uma das vias de defesa parece ter mais vantagens do que a exposição aos agentes oxidantes em organismos preparados. Considerando-se a cinética de morte de *M. tuberculosis* após o tratamento com as LS, principalmente LS06, a idéia de atuação conjunta da depleção de micotiol, através de ligação direta, e a geração de EROs, parece condizer mais com a rapidez da atividade bactericida das LS. Entretanto, mais estudos seriam necessários para afirmar qual a importância de cada mecanismo na atividade bactericida. Além disso, a ligação ao micotiol também deve ser comprovada.

As LS são descritas na literatura como moléculas promíscuas, devido às suas inúmeras atividades biológicas e aos diferentes mecanismos de ação atribuídos a elas. Além da geração de EROs e da alquilação inespecífica de grupos sulfidríla, diversos estudos relatam a inibição de enzimas específicas pelas LS. Karioti e colaboradores (2008) demonstraram a inibição da enzima enoil-ACP redutase (FabI), que participa da biossíntese de ácidos graxos, em *M. tuberculosis*, por três LS extraídas de *Anthemis auriculata*. Entretanto, os testes de inibição foram realizados diretamente na enzima. Apesar de a atividade micobacteriana ter sido comprovada posteriormente, a associação da

inibição da enzima com essa atividade não foi devidamente comprovada. Este mecanismo não parece ter associação com a atividade das LS estudadas neste trabalho, quando considerado o perfil transcricional e também a atividade frente a bacilos em estado não-replicativo, o que dificilmente ocorre com inibidores da síntese da parede celular. Estudos indicam que a atividade antimalária da artemisinina parece estar associada, além da geração de EROs, à inibição da enzima ATPase PfATP6 (SHANDILYA et al., 2013). Já estudos de Bujnicki e colaboradores (2012) demonstram que a LS mexicanina-I está envolvida na inibição da transcrição induzida pelo proto-oncogene *c-myb* em células tumorais. O isolamento de mutantes espontâneos após o tratamento com altas concentrações de LS06 e LS07 indica que estes compostos também podem atuar em alguma proteína específica. Entretanto, devido à grande dificuldade na seleção dos mutantes, é provável que os mecanismos inespecíficos, como geração de EROs e ligação a grupos sulfidríla, também desempenhem um papel importante para sua atividade antimicobacteriana. A identificação de mutações em genes específicos poderá melhorar o entendimento do mecanismo de ação desses compostos.

Em estudo de revisão publicado no ano de 1999, Schimidt afirmou que, dificilmente, alguma LS além de artemisinina se tornaria um fármaco. Entretanto, de acordo com Ghantous e colaboradores (2010), cerca de 90% das publicações relacionadas às atividades biológicas de LS foram publicadas a partir da década de 1990, o que indica que essas moléculas receberam maior visibilidade a partir desse período. Atualmente, três LS encontram-se em estudos clínicos quanto à atividade antitumoral, e as LS são consideradas moléculas promissoras para o tratamento do câncer. Além disso, diversos derivados da artemisinina encontram-se no mercado para o tratamento da malária. Com os avanços da ciência, possibilitando o uso da nanotecnologia na produção de fármacos e de recursos de informática para o planejamento racional de medicamentos, as possibilidades de exploração das atividades biológicas dessas moléculas são muito amplas e constituem um campo de pesquisa digno de ser explorado. Ainda, o mecanismo de ação das LS estudadas neste trabalho não se assemelha ao dos fármacos utilizados atualmente no tratamento da TB, nem a nenhum dos fármacos em estudo clínico, o que também faz desses compostos promissores para futuros estudos em *M. tuberculosis*.

## 8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- O extrato bruto (ECU) e as frações hexânica (FHCU), acetato de etila (FACU) e diclorometano (FDCU) de *C. uniflora* e a fração diclorometano de *C. pinnatifida* (FDCP) apresentaram atividade frente à cepa *M. tuberculosis* H37Rv, com concentração inibitória mínima (MIC) de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 25 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. As frações FHCU, FDCU e FDCP apresentaram concentração inibitória mínima (MBC) correspondente à MIC, enquanto ECU e FACU apresentaram atividade bacteriostática.
- Dentre os compostos isolados, as lactonas sesquiterpênicas (LS) apresentaram os melhores resultados quanto à atividade antimicobacteriana e foram selecionadas para a continuação dos estudos. Seus valores de MIC variaram entre 6,25 µg/mL e 25 µg/mL, enquanto sua MBC foi correspondente a 2xMIC.
- Nenhum dos extratos apresentou atividade frente às cepas padrão *M. avium* ATCC 25398 e *M. fortuitum* ATCC 6841, nas concentrações testadas.
- As LS apresentaram seletividade moderada para *M. tuberculosis*, com índices de seletividade das LS 01-07 variando entre 1,77 e 11,88.
- Os compostos LS01, LS05, LS06 e LS07 apresentaram atividade antimicobacteriana tempo e dose dependente. Reduções da carga bacteriana a zero foram observadas para LS06 em concentrações a partir de 2xMIC, e para LS07 a partir de 8xMIC.
- As LS apresentaram boa atividade frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a isoniazida (INH) e rifampicina (RMP), o que indica que não há resistência cruzada entre estes compostos e os fármacos utilizados clinicamente.
- No ensaio de combinação antimicrobiana, as LS não apresentaram interação com INH, nem com RMP.
- LS06 e LS07 apresentaram atividade bactericida frente a *M. tuberculosis* em estado não-replicativo, em concentrações a partir de 4xMIC e 8xMIC, respectivamente. LS01 e LS05 não foram ativas.
- LS01, LS06 e LS07 apresentaram atividade antimicobacteriana em modelo de macrófagos infectados com *M. tuberculosis*. Os compostos foram capazes de proteger as células infectadas em concentrações

correspondentes à MIC, além de LS06 e LS07 também reduziram a contagem bacteriana. Em concentrações inferiores à MIC, os compostos não foram ativos, e em concentrações superiores, foram citotóxicos.

- LS01 apresentou redução estatisticamente significativa no número de unidades formadoras de colônia (UFC) após tratamento do granuloma-*like* na concentração 100  $\mu$ M, em relação ao grupo controle não tratado.
- Os parâmetros físico-químicos estimados computacionalmente indicam que as LS estudadas apresentam boa biodisponibilidade oral com alta capacidade de absorção e permeabilidade.
- As predições das propriedades farmacocinéticas indicam que os compostos estudados apresentam boa absorção intestinal e permeabilidade celular. Entretanto, apresentam altas taxas de ligação às proteínas plasmáticas e sofrem significativo metabolismo de primeira passagem.
- Os índices de bioatividade sugerem que as LS estudadas possam atuar como inibidores enzimáticos e ligantes de receptores nucleares.
- O alinhamento das moléculas indicou que a presença de um terceiro acceptor de ligação hidrogênio, na posição de alinhamento entre LS01, LS06 e LS07, além dos dois presentes no anel lactônico, pode contribuir para a atividade antimicobacteriana.
- O perfil transcricional de *M. tuberculosis* tratado com LS01, LS06 e LS07 foi muito semelhante entre os compostos. Dentre os 121, 302 e 513 genes diferencialmente expressos após exposição a LS01, LS06 e LS07, respectivamente, destacou-se a superexpressão dos genes *trxA*, *trxB*, *trx-2*, *thiX*, *cysA*, *cysK2*, *cysM*, *cysW*, *cysT*, *moeB1*, *moaE1*, *rmlB*, *rmlC*, *rpiB*, *argB*, *agrC*, *argD*, *argF*, *argG*, *argH*, *argJ*, *argR*, *hsp*, *clpB*, *katG*, *sigH* e *sigE*.
- A análise do perfil transcricional permitiu associar estes compostos com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que foi comprovado pela detecção de peróxido de hidrogênio em culturas tratadas com LS06 e LS07. Este perfil também pode estar associado a uma resposta referente a um mecanismo geral proposto para as LS. A alquilação de resíduos cisteína de proteínas de *M. tuberculosis* e do micotiol, pelos compostos estudados, pode ser capaz de alterar o balanço redox bacteriano.
- Foram isolados três mutantes espontâneos após tratamento de *M. tuberculosis* H37Rv com altas concentrações de LS06, enquanto 13 foram isolados após tratamento com altas concentrações de LS07. A análise do sequenciamento do genoma completo está em andamento e

seus resultados poderão auxiliar no entendimento do mecanismo de ação desses compostos.

Considerando-se sua rápida atividade bactericida, a capacidade de atuar em *M. tuberculosis* em estado não-replicativo e seu mecanismo de ação, que parece ser diferente dos fármacos utilizados atualmente no tratamento da TB e também dos fármacos em estudo clínico, as LS estudadas neste trabalho, com destaque para LS06, podem ser consideradas promissoras para futuros estudos quanto à atividade antimicobacteriana.



## 9 PERSPECTIVAS

Espera-se dar continuidade aos estudos com as LS estudadas neste trabalho, especialmente LS06, a qual apresentou os resultados mais promissores.

Estudos de nanoencapsulação poderão ser conduzidos com o objetivo de contornar os problemas encontrados quanto à toxicidade e distribuição das LS. Além disso, a nanoencapsulação poderá servir como ferramenta para que outras propriedades destes compostos sejam exploradas, em estudos utilizando-se modelos celulares ou até mesmo animais. Alterações nas estruturas dos compostos, baseadas em estudos *in silico*, também poderão ser realizadas com esse propósito.

Os resultados do sequenciamento do genoma completo dos mutantes espontâneos obtidos após o tratamento com LS06 e LS07 pode trazer mais informações sobre o mecanismo de ação destes compostos, o que pode melhorar seu entendimento ou gerar novas perguntas sobre o assunto.



## REFERÊNCIAS

ABUZEID, N.; KALSUM, S.; LARSSON, M.; GLADER, M.; ANDERSSON, H.; RAFFETSEDER, J.; PIENAAR, E.; EKLUND, D.; ALHASSAN, M.S.; ALGADIR, H.A.; KOKO, W.S.; SCHÖN, T.; MESAİK, M.A.; ABDALL, O.M.; KHALID, A.; LERM, M. Antimycobacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Sudan to treat infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.157, p.134-139, 2014.

AGARWAL, D.; SHARMA, M.; DIXIT, S.K.; DUTTA, R.K.; SINGH, A.K.; GUPTA, R.D.; AWASTHI, S.K. *In vitro* synergistic effect of fluoroquinolone analogues in combination with artemisinin against *Plasmodium falciparum*; their antiplasmodial action in rodent malaria model. **Malaria Journal**, v.14, p.48-55, 2015.

AHSAN, M. J.; SAMY, J. G.; KHALILULLAH, H.; NOMANI, M. S.; SARASWAT, P.; GAUR, T. R.; SINGH, A. Molecular properties prediction and synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole analogues as potent antimicrobial and antitubercular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 7246-7250, 2011.

ALARCON, M.; WEIGERT, G.; DUK, S.; GARCIA, M.A. Genotoxic effects of ovatifolin acetate, a sesquiterpene lactone isolated from *Podanthus ovatifolius* Lag. (Compositae). **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.8, n.2, p.73-76, 1992.

ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; WILLIAMS, M.; van HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; van PITTIUS, N. C. G. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases** [serial on the Internet], 2010. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/8/10-0314.htm>. Acesso em: jun/2014.

AMOAH, S.K.S., CRUZ, A.C.H., SOUZA, M.M., CAMPOS, F.R., BARISON, A., BIAVATTI, M.W. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). **Phytochemistry**, v.87, p. 126-132, 2013.

ANDRIES, K.; VERHASSELT, P.; GUILLEMONT, J.; GOHLMAN, H.W.H.; NEEFS, J.-M.; van GESTEL, J.; TIMMERMAN, P.; ZHU, M.; LEE, E.; WILLIAMS, P.; CHAFFOY, D.; HUITRIC, E.; HOFFNER, S.; CAMBAU, E.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LOUNIS, N.; JARLIER, V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.307, p.223-227, 2005.

ANISIMOVA, Y.V.; GELPERINA, S.I.; POLOQUIN, C.A.; HEIFETS, L.B. Nanoparticles as antituberculosis drug carriers: effect on activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocyte-derived macrophages. **Journal of Nanoparticles Research**, v.2, p.165-171, 2000.

AREND, S. M.; van SOOLINGEN, D.; OTTENHOFF, T.H. M. Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria. **Current opinion in pulmonary medicine**, v.15, n.3, p. 201-208, 2009.

ASLUND, F.; BECKWITH, J. Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. **Cell**, v.96, n.6, p.751-753, 1999.

BANYAL, S.; MALIKA, P.; TULIA, H.S.; MUKHERJEEA, T.K. Advances in nanotechnology for diagnosis and treatment of tuberculosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.19, n.3, p.289-287, 2013.

BARRERA, L. The Basics of Clinical Bacteriology. *In*: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007.

BETTS, J.C.; LUKEY, P.T.; ROBB, L.C.; McADAM, R.A.; DUNCAN, K. Evaluation of nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. **Microbiology**, v.43, n.3, p.717-731, 2002.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Modified eudesmanolides and other sesquiterpene lactones from *Wunderlichia mirabilis* and *Actinoseris polymorpha*. **Phytochemistry**, v.20 n. 7, p. 1631-1634, 1981.

BOLIGON, A.A.; AGERTT, V.; JANOVIK, V.; CRUZ, R.C.; CAMPOS, M.M.A.; GUILLAUME, D.; ATHAYDE, M.L.; SANTOS, A.R.S. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.1, p.45-52, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1.ed. Brasília, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica conjunta N° 01/2009. **Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento**. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde / Fundação Nacional da Saúde. Vigilância Epidemiológica. **Informe Técnico da Tuberculose**.2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tuberculose: situação epidemiológica**, 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/27/taxa-incidencia-tuberculose-1990-2015-MAIO-2016-corrigida.pdf> . Acesso em: 10/06/2016.

BROSCH,R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE,M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER,T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A.S.; SAMPER, S.; van SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, p. 3684-3689, 2002.

BUJNICKI, T.; WILCZEK, C.; SCHOMBURG, C.; FELDMANN, F.; SCHLENKE, P.; MÜLLER-TIDOW, C.; SCHMIDT, T.J.; KLEMPNAUER, K-H. Inhibition of myb-dependent gene expression by

the sesquiterpene lactone mexicanin-I. **Leukemia**, v.26, p.615-622, 2012.

CALEFFI-FERRACIOLI, K.R.; MALTEMPE, F.G.; SIQUEIRA, V.L.D.; CARDOSO, S.R. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v.93, p. 660-663, 2013.

CALERA, M.R.; SOTO, F.; SANCHEZ, P.; BYE, R.; HERNANDEZ-BAUTISTA, B.; ANAYA, A.L.; LOTINA-HENNSSEN, B.; MATA, R. Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. **Phytochemistry**, v.40, n.2, p.49-425, 1995.

CANTRELL, C.L.; FRANZBLAU, S.G.; FISCHER, N.H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Medica**, v.67, n.8, p.685-694, 2001.

CAMPOS, H.S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**, v. 15, p. 29-35, 2006.

CARTAGENA, E.; ALVA, M.; MONTANARO, S.; BARDÓN, A. Natural sesquiterpene lactones enhance oxacilin and gentamicin effectiveness against pathogenic bacteria without antibacterial effects on beneficial lactobacilli. **Phytotherapy Research**, v.29, p.695-700, 2015.

CÉSPEDES, C.L.; ALARCÓN, J.; AVILA, J.G.; EL-HAFIDI, M. Anti-inflammatory, antioedema e gastroprotective activities of *Aristolelia chilensis* extract, part 2. **Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas**, v.9, n.6, p.432-439, 2010.

CHATUVERDI, D. Sesquiterpene lacones: structural diversity and their biological activities. In: TIWARI, V.K.; MISHRA, B.B. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**. Research Signpost: Trivandum, 2011, p.313-334.

CHAVADI, S.S.; STIRRETT, K.L.; EDUPUGANTI, U.R.; VERGNOLLE, O.; SADHANANDAN, G.; MARCHIANO, E.; MARTIN, C.; QIU, W-G.; SOLL, C.E.; QUADRI, L.E.N. Mutational and Phylogenetic Analyses of the Mycobacterial *mbt* Gene Cluster. **Journal of Bacteriology**, v.193, n.21, p.5905-5913, 2011.

CLEMENS, D.L.; LEE, B-Y.; XU, M.; THOMAS, C.R.; MENG, H.; FERRIS, D.; NEL, A.E.; ZINK, J.I.; HORWITZA, M.A. Targeted Intracellular Delivery of Antituberculosis Drugs to *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Macrophages via Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.5, p.2535-2545, 2012.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAEELS, K.; KROGH, A.; McLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v.393, p.537-544, 1998.

CONNELL, N. D.; NIKAIIDO, H. **Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control**. Ed B.R. Bloom. ASM Press: Washington D.C., 1994, p.333.

COOK, G. M.; BERNEY, M.; GEBHARD, S.; HEINEMANN, M.; COX, R.; DANILCHANKA, O.; NIEDERWEIS, M. Physiology of mycobacteria. **Advances in microbial physiology**, v. 55, p. 81-182, 2009.

COOK, J. L. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. **British Medical Bulletin**, v.96, p. 45-59, 2010.

CORONADO-ACEVES, E.W.; VELÁZQUEZ, C.; ROBLES-ZEPEDA, R.E.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.; GÁLVEZ-RUIZ, J.C.; GARIBAY-ESCOBAR, A. Reynosin and santamarine: two sesquiterpene lactones from *Ambrosia confertiflora* with bactericidal activity against clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Pharmaceutical Biology**, v.14, p.1-6, 2016.

COSTA, A.; PINHEIRO, M.; MAGALHÃES, J.; RIBEIRO, R.; SEABRA, V.; REIS, S.; SARMENTO, B. The formulation of nanomedicines for treating tuberculosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.102, p.102-115, 2016.

CUI, L.; SU, X-Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.7, n.8, p.999-1013, 2009.

D'ANNEO, A.; CARLISI, D.; LAURICELLA, M.; PULEIO, R.; MARTINEZ, R.; DI BELLA, S.; DI MARCO, P.; EMANUELE, S.; DI FIORE, R.; GUERCIO, A.; VENTO, R.; TESORIERE, G. Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. **Cell and Death Disease**, v.4, p.e891, 2013.

DASHTI, Y.; GRKOVIC, T.; QUINN, R.J. Predicting natural product value, an exploration of anti-TB drug space. **Natural Product Reports**, v.31, p.990-998, 2014.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. 2.ed. London: John Wiley & sons Ltd, 2002.

DHILLON, J.; MITCHISON, D.A. Activity *in vitro* of Rifabutin, FeE 22807, Rifapentine, and Rifampin against *Mycobacterium microti* and *M. tuberculosis* and Their Penetration into Mouse Peritoneal Macrophages. **The American Review of Respiratory Disease**, v.145, n.1, p.212-214, 1992.

DHILLON, J.; ANDRIES, K.; PHILLIPS, P.P.J.; MITCHISON, D.A. Bactericidal activity of the diarylquinoline TMC207 against *Mycobacterium tuberculosis* outside and within cells. **Tuberculosis**, v.90, p.301-305, 2010.

DIVE – **Diretoria de Vigilância Epidemiológica**. Boletim Epidemiológico Barriga Verde, 2016. Disponível em: [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Informativo\\_Tuberculose.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Informativo_Tuberculose.pdf) Acesso em: 10/06/2016.

DOBSON, C.M. Chemical space and biology. **Nature**, v.432, p.824-828, 2004.

DOWNING, K.J.; BETTS, J.C.; YOUNG, D.I.; McADAM, R.A.; KELLY, F.; YOUNG, M.; MIZRAHI, V. Global expression profiling of strains harbouring null mutations reveals that the five *rpf*-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* show functional redundancy. **Tuberculosis**, v.84, n.3, p.167-179, 2004.

DROR, O.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV R.; WOLFSON, H.J.  
Novel approach for efficient pharmacophore-based virtual screening: method and applications. **Journal Chemical Information and Modeling**, v.49, n.10, p.2333-2343, 2009.

DUARTE, R.S.; LOURENÇO, M.C.; FONSECA, L. S.; LEÃO, S.C.; AMORIM EDE, L.; ROCHA, I. L.; COELHO, F.S.; VIANA-NIERO, C.; GOMES, K. M.; SILVA, M.G.; LORENA, N.S.; PITOMBO, M.B.; FERREIRA, R.M.; GARCIA, M.H.; OLIVEIRA, G.P.; LUPI, O.; VILAÇA, B.R.; SERRADAS, L.R.; CHEBABO, A.; MARQUES, E.A.; TEIXEIRA, L.M.; DALCOLMO, M.; SENNA, S.G.; SAMPAIO, J. L. Epidemic postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2149-2155, 2009.

DURAI PANDIYAN, V.; AL-HARBI, N.A.; IGNACIMUTHU, S.; MUTHUKUMAR, C. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicina plat, *Costus speciosus* (Koen ex.Retz.) Sm. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v.12, p.13-19, 2012.

DUSSURGET, O.; STEWART, G.; NEYROLLES, O.; PESCHER, P.; YOUNG, D.; MARCHAL, G. Role of *Mycobacterium tuberculosis* Copper-Zinc Superoxide Dismutase. **Infection and Immunity**, v.69, n.1, p.529-533, 2001.

EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. **Cellular Microbiology**, v.11, n.8, p.1170-1178, 2009.

ERICSSON, T.; BLANK, A. von HAGENS, C.; AHSTON, M.; ÄBELÖ, A. Population pharmacokinetics of artesunate and

dihydroartemisinin during long-term administration of artesunate to patients with metastatic breast cancer. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.70, p.1453-1463, 2014.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> . Acesso em: 10/06/2016.

FALKINHAM, J. O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. **Journal of applied microbiology**, v.107, n.2, p. 356-367, 2009.

FERRAZ, A.B.F.; PINHEIRO, S.P.; OLIVEIRA, P.A.; LINO, F.L. PICADA, J.N.; PEREIRA, P. Pharmacological and genotoxic evaluation of *Calea clematidea* and *Calea uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.6, p.858-862, 2009.

FERREIRA, Z.S.; ROQUE, N.F.; GOTTLIEB, O.R.; OLIVEIRA, F.; GOTTLIEB, H.E. Structural classification of germacranolides from *Calea* species. **Phytochemistry**, v.19, p.1481-1484, 1980.

FERRUCCI, V; BOFFA, I; MASI, G.; ZOLLO, M. Natural compounds for pediatric cancer treatment. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.389, n.2, p.131-149, 2016.

FISCHER, N.H.; LU, T.; CANTRELL, C.L.; CASTANEDA-ACOSTA, J.; QUIJANO, L.; FRANZBLAU, S.G. Antimycobacterial evaluation of Germacranolides. **Phytochemistry**, v.49, n. 2, p. 559-564, 1998.

FLACH, A.; GREGEL, B.; SIMIONATTO, E.; SILVA, U.F.; ZANATTA, N.; MOREL, A.F.; LINARES, C.E.; ALVES, S.H. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. **Planta Medica**, v.68, p.836-838, 2002.

FLYNN, J.L.; CHAN, J.; LIN, P.L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. **Mucosal Immunology**, v.4, n.3, p. 271-278, 2011.

FU, L.M. Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. **Tuberculosis**, v.86, p. 134-143, 2006.

GARCÍA, A.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; PALMA-NICOLÁS, J.P.; RIVERA, G. Recent advances in antitubercular natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.1-23, 2012.

GASPAR, M.M.; CRUZ, A.; PEHA, A.F.; REYMÃO, J.; SOUSA, A.C.; ELEUTÉRIO, C.V.; DOMINGUES, S.A.; FRAGA, A.G.; FILHO, A.L.; CRUZ, M.E.; PEDROSA, J. Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, n.1, p.37-45, 2008.

GELPERINA, S.; KISISCH, K.; ISEMAN, M.D.; HEIFETS, L. The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis. **Pulmonary Perspective**, 172, p.1487-1490, 2005.

GEMECHU, A.; GIDAY, M.; WORKU, A.; AMENI, G. *In vitro* anti-mycobacterial activity of selected medicinal plants against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, p.291-296, 2013.

GENGENBACHER, M.; RAO, S.P.S.; PETHE, K.; DICK, T. Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. **Microbiology**, v.156, p.81-87, 2010.

GHANTOUS, A.; GALI-MUHTASIB, H.; VUORELA, H.; SALIBA N.A.; DARWICHE N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? **Drug Discovery Today**, v.15, n. 15/16, p. 668-678, 2010.

GINSBERG, A.M. **TB Drug Development: pipeline realities**. Washington DC: TB Alliance, 2008.

GINSBERG, A.M. Drugs in development for tuberculosis. **Drugs**, v.70, n.17, p. 2201-2214, 2010.

GOMES, M.; GIL, J.F. Topical anti-inflammatory activity of *Calea prunifolia* HBK (Asteraceae) in the TPA model of mouse ear

inflammation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, n.12, p.2391-2395, 2011.

GRANT, C.M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin system in yeast growth and response to stress conditions. **Molecular Microbiology**, v.39, n.3, p.533-541, 2001.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S. M.; HORSBURGH, R.; HIOTT, G.; IADEMARCO, M. F.; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; von REYN, C.F.; WALLACE, R. J.; WINTHROP, K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nonbubertuclous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.175, n.4, p. 367-416, 2007.

GRIFFITH, D. E. Nontuberculous mycobacterial lung disease. **Current opinion in Infectious Diseases**, v.23, p. 185-190, 2010.

GRIFFITHS, G.; NYSTRÖM, B.; SABLE, S.B.; KHULLER, G.K. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. **Nature Reviews**, v.8, p.828-834, 2010.

GUPTA, S.; THAPAR, M.M.; WERNSDORFER, W.H.; BJÖRKMAN, A.B. In Vitro Interactions of Artemisinin with Atovaquone, Quinine, and Mefloquine against *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.5, p.1510-1515, 2002.

GUPTA, A.; KAUL, A.; TSOLAKI, A.G.; KISHORE, U.; BHAKTA, S. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation. **Immunobiology**, v.217, p.363-374, 2012.

GUTIERREZ, R. S.; SANTOS, B.R.; ESPINA, C. A. A.; AZAMBUJA, H. C. P.; SILVA, L. C. C. Tuberculose. In: SILVA, L. C. C. **Condutas em pneumologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p.412-444.

GUZMÁN, J.D.; GUPTA, A.; BUCAR, F.; GIBBONS, S.; BHAKTA, S. Antimycobacterials from natural sources: ancient times, antibiotic era and novel scaffolds. **Frontiers in Bioscience**, v.17, p.1861-1881, 2012.

HE, Q.; ZHANG, Z.; GAO, F.; LI, Y.; SHI, J. In vivo biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: effects of particle size and PEGylation. **Small**, v.7, n.2, p.271-280, 2011.

HERSHKOVITZ, I.; DONOGHUE, H.D.; MINNIKIN, D.E.; BESRA, G.S.; GERNAEY, A.M.; GALILI, E.; ESHED, V.; GREENBLATT, C.L.; LEMMA, E.; BAR-GAL, G.K.; SPIGELMAN, M. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. **PLoS ONE**, v.3, n.10, p.e3426, 2008.

HERZ, W.; GROOTE, R. Desacetyleupaserrin and nevadensin from *Helianthus pumilus*. **Phytochemistry**, v.16, p.1307-1308, 1977.

HOFFMANN, D. Terpenes. *In*: HOFFMANN, D. **Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine**. Healing Arts Press: Vermont, 2003. p.62-89.

HWANG, D.R.; WU, Y.S.; CHANG, C.W.; LIEN, T.W.; CHEN, W.C.; TAN, U.K.; HSU, J.T.; HSIEH, H.P. Synthesis and anti-viral activity of a series of sesquiterpene lactones and analogues in the subgenomic HCV replicon system. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.14, n.1, p.83-91, 2006.

INBAR Y.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR O.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. Deterministic Pharmacophore Detection via Multiple Flexible Alignment of Drug-Like Molecules. Proc. of RECOMB, **Lecture Notes in Computer Science**. Springer Verlag , v. 3692, p.423-434, 2007.

ISACCHI, B.; ARRIGUCCI, S.; MARCA, G.; BERGONZIL, M.C.; VANNUCCHI, M.G.; NOVELLI, A.; BILIA, A.R. Conventional and long-circulating liposomes of artemisinin: preparation, characterization, and pharmacokinetic profile in mice. **Journal of Liposome Research**, v.21, n.3, p.237-244, 2011.

JIMENEZ, V.; KEMMERLING, U.; PAREDES, R.; MAYA, J.D.; SOSA, M.A.; GALANTI, N. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: a new therapeutic target? **Phytochemistry**, v.21, n.11, p.1411-1418, 2014.

JIMENEZ-ARELLANES, A.; MECKES, M.; RAMIREZ, R.; TORRES, J.; LUNA-HERRERA, J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. **Phytotherapy Research**, v.17, p.903-908, 2003.

JOHNSON, M.M.; ODELL, J.A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Journal of Thoracic Disease**, v.6, n.3, p.210-220, 2014.

KARIOTI, A.; SKAL TSA, H.; ZHANG, X.; TONGE, P.J.; PEROZZO, R.; KAISER, M.; FRANZBLAU, S.G.; TASDEMIRF, D. Inhibiting enoyl-ACP reductase (FabI) across pathogenic microorganisms by linear sesquiterpene lactones from *Anthemis auriculata*. **Phytomedicine**, v.15, p.1125-1129, 2008.

KATOCH, V.M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian Journal of Medical Research**, v.120, p.290-304, 2004.

KHAN, S.I.; ABOURASHED, E.A.; KHAN, I.A.; WALKER, L.A. Transport of parthenolide across human intestinal cells (Caco-2). **Planta Medica**, v.69, n.11, p.1009-1012, 2003.

KISICH, K.O.; GELPERINA, S.; HIGGINS, M.P.; WILSON, S.; SHIPULO, E.; OGANESYAN, E.; HEIFETS, L. Encapsulation of moxifloxacin within poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles enhances efficacy against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Pharmaceutics**, v.345, p.154-162, 2007.

KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v.228, n.4703, p.1049-1055, 1985.

KOLYVA, A.S.; KARAKOUSIS, P.C. Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance. In: CARDONA, J. **Understanding Tuberculosis – New Approaches to Fighting Against Drug Resistance**. 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/old-and-new-tb-drugs-mechanisms-of-action-and-resistance>. Acesso em: 20/07/2016.

KÖNIG, M.; von HAGENS, C.; HOTH, S.; BAUMANN, I.; WALTER-SACK I.; EDLER, L.; SERTEL, S. Investigation of ototoxicity of artesunate as add-on therapy in patients with metastatic or locally advanced breast cancer: new audiological results from a prospective, open, uncontrolled, monocentric phase I study. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.77, p.413-427, 2016.

KOUL, A.; VRANCKX, L.; DENDOUGA, N.; BALEMANS, W.; van den WYNGAERT, I.; VERGAUWEN, K.; GÖHLMANN, H.W.; WILLEBRORDS, R.; PONCELET, A.; GUILLEMONT, J.; BALD, D.; ANDRIES, K. Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.37, p.25273-25280, 2008.

KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v.469, p.483-490, 2011.

KWAN, C.K.; ERNS, J. D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p. 351-376, 2011.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEIJA, G.I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. 1.ed. European Commission, International Cooperation for Developing Countries, 2004.

LEVIN, B. R.; ROZEN, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.556-562, 2006.

LIMA, T.C.; SANTOS, A.D.C.; COSTA, D.T.M.; SOUZA, R.J.; BARISON, A.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M.W. Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* and evaluation of their leishmanicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.25, n.1, p.7-10, 2015.

LIPINSKI, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 235-249, 2000.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and

permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.1, p. 337-341, 2004.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2-delta-delta-CT Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOBUE, P.A.; ENARSON, D.A.; THOEN, T.C. Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis and treatment in the United States. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v.10, n.14, p. 1226-1232, 2010.

LOPES, A. J.; CAPONE, D.; MOGAMI, R.; TESSAROLO, B.; CUNHA, D. L.; CAPONE, R. B.; SIQUEIRA, H. R.; JANSEN, J.M. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão**, v.15, p. 253-261, 2006.

LUNA-HERRERA, J.; COSTA, M.C.; GONZÁLEZ, H.G.; RODRIGUES, A.I.; CASTILHO, P.C. Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.548-552, 2007.

MAKAROV, V.; MANINA, G.; MIKUSOVA, K.; MÖLLMANN, U.; RYABOVA, O.; SAINT-JOANIS, B.; DHAR, N.; PASCA, M.R.; BURONI, S.; LUCARELLI, A.P.; MILANO, A.; de ROSSI, E.; BELANOVA, M.; BOBOVSKA, A.; DIANISKOVA, P.; KORDULAKOVA, J.; SALA, C.; FULLAM, E.; SCHNEIDER, P.; MCKINNEY, J.d.; BRODIN, P.; CHRISTOPHE, T.; WADDELL, S.; BUTCHER, P.; ALBRETHSEN, J.; ROSENKRANDS, I.; BROSCHE, R.; NANDI, V.; BHARATH, S.; GAONKAR, S.; SHANDIL, R.K.; BALASUBRAMANIAN, V.; BALGANESH, T.; TYAGI, S.; GROSSET, J.; RICCARDI, G.; COLE, S.T. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. **Science**, v.324, p.801-804, 2009.

MALDONADO, E.; MARQUEZ, C.L.; ORTEGA, A. A thymol derivative from *Calea nelsonii*. **Phytochemistry**, v.31, p.2527-2528, 1992.

MANGANELLI, R.; VOSKUIL, M.I.; SCHOOLNIK, G.K.; DUBNAU, E.; GOMEZ, M.; SMITH, I. Role of the extracytoplasmic-function sigma Factor sigH in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. **Molecular Microbiology**, v.45, n.2, 365-374, 2002.

MARCHETTI, G.M.; SILVA, K.A.; SANTOS, A.N.; SOUSA, I.M.O.; TINTI, S.V.; FIGUEIRA, G.M.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E. The anticancer activity of dichloromethane crude extract obtained from *Calea pinnatifida*. **Journal of Experimental Pharmacology**, v.4, p.157-162, 2012.

MARRAS, T.K.; CHEDORE, P.; YING, A. M.; JAMIESON, F. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. **Thorax**, v.64, p. 661-666, 2007.

MARTINS, D.; CARRION, L.L.; RAMOS, D.F.; SALOME, K.S.; SILVA, P.E.A.; BARISON, A.; NUNEZ, C.V.N. Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). **BioMed Research International**, v.2013, p.1-7, 2013.

McCUTCHEON, A.R.; STOKES, R.W.; THORSON, L.M.; ELLIS, S.M.; HANCOCK, R.E.W.; TOWERS, G.H.N. Anti-mycobacterial screening of British Columbian medicinal plants. **International Journal of Pharmacognosy**, v.35, n.2, p.77-83, 1997.

McGAW, L.J.; LALL, N.; MEYER, J.J.; ELOFF, J.N. The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, n.3, p.482-500, 2008a.

McGAW, L.J.; LALL, N.; LOKEW, T.M.H.; MICHEL, A.L.; MEYER, J.J.M.; ELOFF, J.N. Purified compounds and extracts from *Euclea* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast-growing mycobacteria. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.7, p.1429-1433, 2008b.

- McGRATH, E. E.; BLADES, Z.; McCABE, J.; JARRY, H.; ANDERSON, P.B. Nontuberculous mycobacteria and the lung: from suspicion to treatment. **Lung**, v.188, n.4, p. 269-282, 2010.
- MDLULI, K.; KANEKO, T.; UPTON, A. The tuberculosis drug discovery and development pipeline and emergin drug targets. **Cold Spring Harbor Perspective Medicine**, v.5, p. a021154, 2015.
- MEHRA, S.; KAUSHAL, D. Functional Genomics Reveals Extended Roles of the *Mycobacterium tuberculosis* Stress Response Factor  $\sigma^H$ . **Journal of Bacteriology**, v.191, n.12, p.3965-3980, 2009.
- MEHTA, A.; SRIVASTVA, G.; KACHHWAHA, S.; SHARMA, M.; KOTHARI, S.L. Antimycobacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. against drug sensitive and drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and MOT clinical isolates. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, p.195-200, 2013.
- MESHNICK, S.R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal of Parasitology**, v.32, n.13, p.1655-1660, 2002.
- Molinspiration Cheminformatics, Web Enabled Software for Large-Scale Calculation pf Molecular Properties and Database Searches. Free Online Molecular Descriptor Calculations. Disponível em: <http://www.molinspiration.com/services/properties.html>. Acesso em: 18/09/2014.
- MONAHAN, I.M.; BETTS, J.; BANERJEE, D.K.; BUTCHER, P.D. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. **Microbiology**, v.147, p.459-471, 2001.
- MOSTOWY, S.; BEHR, M. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinics in chest medicine**, v.26, n.2, p. 207-216, 2005.
- MUHINDO, M.K.; KAKURU, A.; JAGANNATHAN, P.; TALISUNA, A.; OSILO, E.; ORUKAN, F.; ARINAITWE, E.; TAPPERO, J.W.; KAHARUZA, F.; KAMYA, M.R.; DORSEY, G. Early parasite clearance following artemisinin-based combination therapy among Ugandan children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Malaria Journal**, v.13, p.32-39, 2014.

NASCIMENTO, A.M.; SILVA, F.S.; OLIVEIRA, D.C. Constituents of *Calea platylepis* Sch. Bip. Ex Baker. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p.993-996, 2002.

NASCIMENTO, A.M.; SALVADOR, M.J.; CADIDO, R.C.; ITO, I.Y.; OLIVEIRA, D.C. Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v.56, n.5, p.663-669, 2004.

NASCIMENTO, A.M.; COSTA, F.C.; THIEMANN, O.H.; OLIVEIRA, D.C.R. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.62, p.353-356, 2007.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **NCI Drug Dictionary**.

Disponível em: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug>. Acesso em: 16/06/2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, p.629-661, 2016.

NEWTON, G.L.; BUCHMEIER, N.; FAHEY, R.C. Biosynthesis and Functions of Mycothiol, the Unique Protective Thiol of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, n.3, p.471-494, 2008.

NEWTON, G.L.; BUCHMEIER, N.; CLAIR, J.J.; FAHEY, R.C. Evaluation of NTF1836 as an inhibitor of the mycothiol biosynthetic enzyme MshC in growing and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.19, n.13, p.3956-3964, 2011.

NGUTA, J.M.; APPIAH-OPONG, R.; NYARKO, A.K.; YEBOAH-MANU, D.; ADDO, P.G.A. Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. **International Journal of Mycobacteriology**, v.4, p.165-183, 2015.

- NGUTA, J.M.; APPIAH-OPONG, R.; NYARKO, A.K.; YEBOAH-MANU, D.; ADDO, P.G.A; OTCHERE, I.; KISSI-TWUM, A. Antimycobacterial and cytotoxic activity of selected medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.182, p.10-15, 2016.
- NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 152-157, 2000.
- OBER, A.G.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. Three benzofurans and a 1,4-dioxin derivative from *Calea* species: molecular structures of calebertin and caleteucrin. **Journal of Natural Products**, v.48, p.242-248, 1985.
- ORME, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1943-1946, 2001.
- O'SHEA, R.; MOSER, H.E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, n.10, p.2871-2878, 2008.
- PAGET, M.S.K.; MOLLE, V.; COHEN, G.; AHARANOWITZ, Y.; BUTTNER, M.J. Defining disulphide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of the sigR regulon. **Molecular Microbiology**, v.42, n.4, p. 1007-1020, 2001.
- PALMERO, D.J. Tuberculosis and HIV/Aids. In: PALOMINO, J. C.; LEÑÓ, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007.
- PALOMINO, J-C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. 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. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p. 864-870, 2004.

PAULI, G.F.; CASE, R.J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, S.; FISCHER, N.H.; FRANZBLAU, S.G. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sciences**, v.78, p.485-494, 2005.

Percepta 2012 - ADME Calculator, A Web-based Application for Predicting ADME Data and Bulding Drug-like Library Using In Silico Method. Disponível em:

[http://www.acdlabs.com/products/percepta/physchem\\_adme\\_tox](http://www.acdlabs.com/products/percepta/physchem_adme_tox).

Acesso em: 22/05/2014.

PHILIPS, J.A.; ERNST, J.D. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.7, p. 353-384, 2012.

PHONPAICHT, S.; VUDDHAKUL, V.; SUBHADHIRASAKUL, S.; WATTANAPIROMSAKUL, C. Evaluation of the antimycobacterial activity of extracts from plants used as self-medication by Aids patients in Thailand. **Pharmaceutical Biology**, v.4, n.1, p.71-75, 2006.

PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.14, p.255-281, 1986.

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. **Cell Host & Microbe**, v.3, n.6, p.399-407, 2008.

PROTOPOPOVA, M.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B.; SAMALA, R.; CHEN, P.; GEARHART, J.; EINCK, L.; NANCY, C.A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.968-974, 2005.

QAIYUMI, S. Macro- and Microdilution Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing. *In*: SCHWALBE, E.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A.C. **Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

RABE, T.; MULLHOLLAND, D.; van STADEN, J. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.91-94, 2002.

RAGHAVAN,S.; ALAGARASU,K.; SELVARAJ, P. Immunogenetics of HIV and HIV associated tuberculosis. **Tuberculosis**, v.92, n.1, p. 18-30, 2011.

RAMOS, R.R.; ALARCON-AGUILAR, F.; LARA-LEMUS, A.; FLORES-SAENZ, J.L. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. **Archives of Medical Research**, v.23, p.59-64, 1992.

RAMOS, D.F.; LEITÃO, G.G.; COSTA, F.N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J.V.; LEITÃO, S.G.; FERNÁNDEZ, S.L.S.; SILVA, P.E.A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, p.670-674, 2008.

RAWAT, B.S.; RAWAT, D.S. Antituberculosis Drug Research: A Critical Overview. **Medicinal Research Reviews**, v.33, n.4, p.693-764, 2013.

RENISS – Rede Nacional de Investigação de Surto e Eventos Adversos em Serviços de Saúde. **Casos de infecção por micobactérias não tuberculosas notificadas**, 2009. Disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite\\_micobacteria/notificados.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/notificados.pdf).

Acesso em: 02/06/2014.

REPETTO, M.G.; BOVERIS, A. Bioactivity of sesquiterpenes: compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.10, n.7, p.615-662, 2010.

ROBLES-ZEPEDA, R.E.; CORONADO-ACEVES, E.W.; VELÁZQUEZ-CONTRERAS, C.A.; RUIZ-BUSTOS, E.; NAVARRO-NAVARRO, M.; GARIBAY-ESCOBAR, A. *In vitro* anti-mycobacterial activity of nine medicinal plants used by ethnic groups in Sonora, Mexico.

**BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, p.329-336, 2013.

ROMERO, M.R.; EFFERTH, T.; SERRANO, M.W.; CASTAÑO, B.; MACIAS, R.I.; BRIZ, O.; MARIN, J.J. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system. **Antiviral Research**, v.68, n.2, p.75-83, 2005.

ROQUE, N.; CARVALHO, N.C. Estudos taxonômicos do gênero *Calea* (Asteraceae, Neurolaeneae) no estado da Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v.62, n.3, p.547-561, 2011.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A.B. Tuberculose. *In*: TARANTINO, A.B. **Doenças pulmonares**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.p. 294-380.

RUIJTER, J.M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W.M.H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; van den HOFF, M.J.B.; MOORMAN, A.F.M. Amplification efficiency : linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v.37, n.6, p. e45, 2009.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GOREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF-kappa B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.7, p.2343-2352, 1999.

RYNDAK, M.B.; SINGH, K.K.; PENG, Z.; ZOLLA-PAZNER, S.; LI, H.; MENG, L.; LAA, S. Transcriptional profilin of *Mycobacterium tuberculosis* replicating *ex vivo* in blood from HIV- and HIV+ subjects. **Plos One**, v.9, n.4, p.1-18, 2014.6

SALLA, M.; FAKHOURY, I.; SALIBA, N.; DARWICHE, N.; GALI-MUHTASIB, H. Synergistic anticancer activities of the plant-derived sesquiterpene lactones salograviolide A and iso-seco-tanaparholide. **Journal of Natural Medicines**, v.67, n.3, p.468-479, 2013.

SALOMON, C.E.; SCHMIDT, L.E. Natural products as leads for tuberculosis drug development. **Current Topics in Medical Chemistry**, v.12, p.735-765, 2012.

SANTOS, S.M.B.P. Lactonas sesquiterpênicas – Aplicações farmacológicas e quimiotaxonômicas. **Boletim SPQ**, v.36, p. 41-43, 1989.

SASSETTI, C.M.; BOYD, D.H.; RUBIN, E.J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. **Molecular Microbiology**, v.48, n.1, p.77-84, 2003.

SASSETTI, C.M.; RUBIN, E.J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.22, p.12989-12994, 2003.

SCHMIDT, T.J. Toxic Activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v.3, p. 577-608, 1999.

SCHMIDT, T.J. Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.33 (PART M), p. 309-392, 2006.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic Acids Research**, v.36, n.2, p.w223-w228, 2008.

SHANDILYA, A.; CHACKO, S.; JAYARAM, B.; GHOSH, I. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. **Scientific Reports**, v.3, a.2513, 2013.

SHARMA, S.K.; MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. **The Indian Journal of Medical Research**, v.120.n.4, p. 316-353, 2004.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Lactin-functionalizes poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.761-766, 2004.

SHARP, J.D.; SINGH, A.K.; PARK, S.T.; LYUBETSKAYA, A.; PETERSON, M.W.; GOMES, A.L.C.; POTLURI, L-P.; RAMAN, S.; GALAGAN, J.E.; HUSSON, R.N. Comprehensive Definition of the SigH Regulon of *Mycobacterium tuberculosis* Reveals Transcriptional Control of Diverse Stress Responses. **PLoS One**, v.11, n.3, p.e0152145, 2016.

SHERMAN, D.R.; MDLULI, K.; HICKEY, M.J.; BARRY, C.E.; STOVER, C.K. AhpC, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biofactors**, v.10, n.2-3, p.211-217, 1999.

SIMIONNATO, C.S.; ROSA, S.C.; WOSNY, A.M.; SILVA, T.P. Arnica da praia II. **Horto didático de plantas medicinais do HU**. 2016. Disponível em: <http://hortomedicinaldohu.ufsc.br>. Acesso em: 12/06/2016.

SKAL TSA, H.; LAZARI, D.; PANAGOULEAS, C.; GEORGIADOU, E.; GARCIA, B.; SOKOVIC, M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. **Phytochemistry**, v.55, p.903-908, 2000.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p.463-496, 2003.

STEENWINKEL, J.E.M.; KNEGT, G.J.; KATE, M.T.; van BELKUM, A.; VERBRUGH, H.A.; KREMER, K.; van SOOLINGEN, D.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.2582-2589, 2010.

STEINBECK, C.; SPITZER, V.; STAROSTA, M.; von POSER, G. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by semiautomatic structure elucidation. **Journal of Natural Products**, v.60, p.627-628, 1997.

SÜLSEN, V.P.; PUENTE, V.; PAPADEMETRIO, D.; BATILE, A.; MARTINO, V.; FRANK, F.M.; LOMBARDO, M.E. Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyi C on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v.11, n.3, p.e0150526, 2016.

SUN, Y.; St CLAIR, D.K.; XU, Y.; CROOKS, P.Q.; St CLAIR, W.H. A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells. **Cancer Research**, v.70, n.7, p.2880-2890, 2010.

TABUTI, J.R.; KUKUNDA, C.B.; WAAKO, P.J. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners in the treatment of tuberculosis and related ailments in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, n.1, p.130-136, 2010.

TAYLOR, R.S.L.; TOWERS, G.H.N. Antibacterial constituents of Nepalese medicinal herb, *Centipeda minima*. **Phytochemistry**, v.47, n.4, p.631-634, 1998.

TEKWU, E.M.; ASKUN, T.; KUETE, V.; NKENGFACK, A.E.; NYASSE, B.; ETOA, F.X.; BENG, V.P. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spice ethno-medically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, n.2, p.374-382, 2012.

THE NOBEL ASSEMBLY AT KAROLINSKA INSTITUTET. **Press Release 2015-10-05**, 2015. Disponível em: [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2015/press.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/press.html). Acesso em: 16/06/2016.

THE PLANT LIST. **The plant list**: a working list of all plant species, 2016. Disponível em: <http://www.theplantlist.org>. Acesso em: 16/06/2016.

VAN DE LOOSDRECHT, A.A.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGENHUIJSE, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. **Journal of Immunological Methods**, v.141, p.15-22, 1991.

van HAAFTEN, C.; BOOT, A.; CORVER, W.E.; van EENDENBURG, J.D.H.; TRIMBOS, B.J.M.Z.; van WEZEL, T. Synergistic effects of the sesquiterpene lactone, EPD, with cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.34, p.38-46, 2015.

van INGEN, J.; BOEREE, M.J.; van SOOLINGEN, D.; MOUTON, J.W. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **Drug Resistance Updates**, v.15, n.3, p.149-161, 2012.

VIBE, C.B.; FENAROLI, F.; PIRES, D.; WILSON, S.R.; BOGOEVA, V.; KALLURU, R.; SPETH, M.; ANES, E.; GRIFFITHS, G.; HILDAHL, J. Thioridazine in PLGA nanoparticles reduces toxicity and improves rifampicin therapy against mycobacterial infection in zebrafish. **Nanotoxicity**, v.10, n.6, p.680-688, 2015.

VONGVANISH, N.; KITTAKOOP, P.; CHAROENCHAI, P.; INTAMAS, S.; SRIKLUNG, K.; THEBTARANONTH, Y. Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. **Planta Medica**, v.72, p.1427-1430, 2006.

VOSKUIL, I.; BARTEK, I.L.; VISCONTI, K.; SCHOONIK, G.K. The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. **Frontiers in Microbiology**, v.2, p.1-12, 2011.

WADDELL, S.J.; BUTCHER, P.D. Use of DNA arrays to study transcriptional responses to antimycobacterial compounds. In: GILLESPIE, S.H.; McHUGH, T.D. **Antibiotic Resistance Protocols**. 2.ed. Methods in Molecular Biology, v.642, p. 75-91, 2010.

WAGNER, S.; KRATZ, F.; MERFORT, I. *In vitro* behavior of sesquiterpene lactones and sesquiterpene lactone-containing plant preparations in human blood, plasma and human serum albumin solutions. **Planta Medica**, v.70, p.227-233, 2004.

WANG, C.; LI, T.; TANG, S.; ZHAO, D.; ZHANG, C.; ZHANG, S.; DENG, S.; ZHOU, Y.; XIAO, X. Thapsigargin induces apoptosis when autophagy is inhibited in HepG2 cells and both processes are regulated by ROS-dependent pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.41, p.167-179, 2016.

WARNER, D. F.; MIZRAHI, V. Tuberculosis chemotherapy: the influence of bacillary stress and damage response pathways on drug efficacy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p.558-570, 2006.

WHO – World Health Organization. **The Global Plan to Stop TB 2006-2015**, 2006. Disponível em: <http://www.stoptb.org/global/plan/>. Acesso em: mai/2012.

WHO – World Health Organization. **Global tuberculosis control 2015**, 2015a. Disponível em:

[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) . Acesso em: 10/06/2012.

WHO – World Health Organization. **Q&A on artemisinin resistance**, 2015b. Disponível em:

[http://www.who.int/malaria/media/artemisinin\\_resistance\\_qa/en/](http://www.who.int/malaria/media/artemisinin_resistance_qa/en/).

Acesso em: 16/06/2016.

WILSON M, DERISI J, KRISTENSEN H-H, IMBODEN P, RANE S, BROWN PO, SCHOOLINK GK. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.22, p. 12833–12838, 1999.

WU, H.; FRONCZEK, F.R.; BURANDT Jr, C.L.; ZJAWIONY, J.K. Antileishmanial germacranolides from *Calea zacatechich*. **Planta Medica**, v.77, n.7, p.749-753, 2011.

YAJKO, D.M.; MADEJ, J.J.; LANCASTER, M.V.; SANDERS, C.A.; CAWTHON, V.L.; GEE, B.; BABST, A.; HADLEY, W.K. Colorimetric Method for Determining MICs of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.9, p. 2324-237, 1995.

YANG, Y-I.; KIM, J-H.; LEE, K-T.; CHOI, J-H. Costunolide induces apoptosis in platinum-resistant human ovarian cancer cells by generating reactive oxygen species. **Gynecologic Oncology**, v.123, p.588-596, 2011.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v.7, n.1, p.6-21, 2003.

ZHANG, S.; ONG, C.N.; SHEN, H.M. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells. **Cancer Letters**, v.208, n.2, p.143-153, 2004.

ZHANG, Q.; LU, Y.; DING, Y.; ZHAI, J.; JI, Q.; MA, W.; YANG, M.; FAN, H.; LONG, J.; TONG, Z.; SHI, Y.; JIA, Y.; HAN, B.; ZHANG, W.; QIU, C.; MA, X.; LI, Q.; SHI, Q.; ZHANG, H.; LI, D.; ZHANG, J.; LIN, J.; LI, L-Y.; GAO, Y.; CHEN, Y. Guaianolide Sesquiterpene

Lactones, a Source To Discover Agents That Selectively Inhibit Acute Myelogenous Leukemia Stem and Progenitor Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.55, n.20, p.8757-8769, 2012.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S.T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature Reviews Drug Discovey**, v.13, p.388-404, 2013.

ZUMLA, A.; RAVIGLIONE, M.; HAFNER, R.; von REYN, C.F. Current concepts: Tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v.368, n.8, p.745-755, 2013.



## APÊNDICE A – Listas dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS01

Lista dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS01, que apresentaram alteração maior que 2 vezes e  $p < 0,05$ . Tratamento realizado em concentração correspondente a 10xMIC, por 4 horas. Sinais negativos indicam redução na expressão gênica.

ID	Nome gene	$p$	Alteração (x)	Descrição
Rv0140		4,98E-06	16,32902	Putative uncharacterized protein
Rv0142		9,70E-06	6,376045	Putative uncharacterized protein
Rv0251c	hsp	6,71E-06	8,644703	HEAT SHOCK PROTEIN HSP (HEAT-STRESS-INDUCED RIBOSOME-BINDING PROTEIN A)
Rv0324		2,33E-04	2,435511	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (POSSIBLY ARSR-FAMILY)
Rv0325		1,98E-04	2,117328	Putative uncharacterized protein
Rv0327c	CYP135A1	2,63E-04	2,608367	Putative cytochrome P450 135A1
Rv0331		0,001896	2,440649	POSSIBLE DEHYDROGENASE/REDUCTASE
Rv0351	grpE	0,012232	2,09896	Protein grpE
Rv0352	dnaJ1	3,22E-04	2,211714	Chaperone protein dnaJ 1
Rv0353	hspR	5,25E-04	2,1401	PROBABLE HEAT SHOCK PROTEIN TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR HSPR (MERR FAMILY)
Rv0384c	clpB	1,90E-05	5,570488	Chaperone protein clpB
Rv0676c	mmpL5	4,56E-06	3,521805	Putative membrane protein mmpL5
Rv0677c	mmpS5	3,36E-04	3,067061	Putative membrane protein mmpS5
Rv0678		0,003341	4,314427	Putative uncharacterized protein
Rv0687		8,64E-05	2,13339	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv0767c		0,005023	2,262019	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv0767c/MT0791

Rv0791c		6,51E-04	2,098358	Putative uncharacterized protein
Rv0792c		7,18E-05	2,594662	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY GNTR-FAMILY)
Rv0793		3,79E-04	2,472204	Putative uncharacterized protein
Rv0794c		2,60E-04	2,36498	PROBABLE OXIDOREDUCTASE
Rv0814c	sseC1	0,004308	2,46178	Putative uncharacterized protein
Rv0816c	thiX	7,98E-06	4,43741	PROBABLE THIOREDOXIN THIX
Rv0847	lpqS	0,022333	2,179677	PROBABLE LIPOPROTEIN LPQS
Rv0990c		3,01E-04	2,243606	Putative uncharacterized protein
Rv1039c	ppe15	4,70E-05	4,620797	Uncharacterized PPE family protein PPE15
Rv1129c		9,57E-06	6,775807	DNA-binding protein, putative
Rv1130		5,47E-05	4,383405	MmgE/PrpD family protein
Rv1131	gltA1	1,28E-05	4,675893	Citrate synthase
Rv1221	sigE	2,19E-05	3,349352	ALTERNATIVE RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR SIGE
Rv1285	cysD	0,001755	2,482379	Sulfate adenylyltransferase subunit 2
Rv1286	cysNC	7,51E-04	2,612667	Bifunctional enzyme cysN/cysC
Rv1296	thrB	0,002727	2,068229	Homoserine kinase
Rv1334		6,71E-06	5,187444	Uncharacterized protein Rv1334/MT1376
Rv1335	cfp10A	1,05E-05	5,624889	9.5 kDa culture filtrate antigen cfp10A
Rv1336	cysM	1,90E-05	3,656501	Cysteine synthase B
Rv1395		3,82E-05	3,836605	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv1395/MT1440
Rv1471	trx-2	2,40E-06	9,493227	PROBABLE THIOREDOXIN TRXB1
Rv1472	echA12	1,03E-05	4,52007	Probable enoyl-CoA hydratase echA12
Rv1528c	papA4	2,68E-06	10,98215	PROBABLE CONSERVED POLYKETIDE SYNTHASE ASSOCIATED PROTEIN PAPA4
Rv1585c		0,001825	2,475746	Possible phage phiRv1 protein
Rv1586c		0,00147	2,209473	Probable phiRv1 integrase///Partial REP13E12 repeat protein

Rv1673c		1,02E-04	3,755862	Putative uncharacterized protein
Rv1674c		2,51E-05	4,438052	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv1767		2,54E-04	3,397024	Putative uncharacterized protein
Rv1801	ppe29	7,84E-06	6,570046	Uncharacterized PPE family protein PPE29
Rv1874		1,53E-05	2,951139	Putative uncharacterized protein
Rv1875		3,43E-06	4,384821	Putative uncharacterized protein
Rv1909c	fur	5,66E-04	2,492063	Ferric uptake regulation protein
Rv1992c	ctpG	6,71E-06	4,663828	Probable cation-transporting ATPase G
Rv1993c		2,90E-04	5,646671	Uncharacterized protein Rv1993c/MT2049
Rv1994c	cmtR	3,43E-06	7,846468	HTH-type transcriptional regulator cmtR
Rv2204c		9,75E-06	3,040924	Protein Rv2204c/MT2260
Rv2391	sir	5,33E-05	3,062617	Sulfite reductase [ferredoxin]
Rv2392	cysH	2,91E-04	2,847194	Probable phosphoadenosine phosphosulfate reductase
Rv2393		1,60E-04	2,819174	Putative uncharacterized protein
Rv2397c	cysA	9,13E-06	4,214468	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein cysA
Rv2398c	cysW	9,75E-06	4,817823	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYSW
Rv2399c	cysT	2,78E-05	3,105601	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYST
Rv2400c	subI	2,44E-05	3,988647	PROBABLE SULFATE-BINDING LIPOPROTEIN SUBI
Rv2465c	rpiB	9,75E-06	4,341317	Ribose-5-phosphate isomerase B
Rv2466c		6,27E-07	13,16279	Putative uncharacterized protein
Rv2601.1		0,001255	3,028378	Putative uncharacterized protein
Rv2602		2,37E-04	2,833476	Putative uncharacterized protein
Rv2640c		9,75E-06	3,182638	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv2641	cadI	3,54E-05	6,250286	Cadmium-induced protein cadI

Rv2642		6,51E-05	6,165968	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv2643	arsC	9,05E-04	3,669795	Arсенal resistance protein/arsenate reductase
Rv2699c		3,05E-05	3,107771	Putative uncharacterized protein
Rv2707		2,91E-04	2,126436	PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv2745c		6,76E-05	2,28677	DNA-binding protein, putative
Rv2806		3,40E-04	2,442019	POSSIBLE MEMBRANE PROTEIN
Rv3017c	esxQ	3,23E-05	2,428152	ESAT-6-like protein esxQ
Rv3054c		3,83E-07	17,5391	Putative uncharacterized protein
Rv3082c	virS	1,43E-04	2,479801	Putative virulence-regulating 38 kDa protein
Rv3119	moaE1	0,015998	2,089992	Molybdopterin-converting factor subunit 2 1
Rv3173c		7,47E-05	3,383414	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY TETR/ACRR-FAMILY)
Rv3174		7,11E-05	3,691703	Oxidoreductase
Rv3175		4,34E-04	2,216434	POSSIBLE AMIDASE (AMINOHYDROLASE)
Rv3176c	mesT	0,003157	2,011245	PROBABLE EPOXIDE HYDROLASE MEST (EPOXIDE HYDRATASE) (ARENE-OXIDE HYDRATASE)
Rv3177		0,001992	2,460425	POSSIBLE PEROXIDASE (NON-HAEM PEROXIDASE)
Rv3205c		5,33E-05	2,178246	Putative uncharacterized protein
Rv3206c	moeB1	1,19E-06	7,665472	HesA/MoeB/ThiF family protein
Rv3221.1		2,68E-06	5,606201	POSSIBLE ANTI-SIGMA FACTOR
Rv3222c		1,28E-06	5,349475	Putative uncharacterized protein
Rv3223c	rpoE	5,86E-06	4,740305	RNA polymerase sigma-E factor
Rv3270	ctpC	7,89E-06	3,027574	Probable cation-transporting P-type ATPase C
Rv3334		0,005382	2,471484	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY MERR-FAMILY)

Rv3463		9,91E-07	22,79493	Putative uncharacterized protein
Rv3464	rmlB	1,90E-05	3,201269	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
Rv3650	PE33	0,00143	2,035225	PE FAMILY PROTEIN
Rv3706c		2,45E-06	10,46143	CONSERVED HYPOTHETICAL PROLINE RICH PROTEIN
Rv3764c		6,71E-06	4,154014	Sensor protein
Rv3765c		2,20E-06	7,781088	PROBABLE TWO COMPONENT TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3833		0,003003	2,455668	TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARAC-FAMILY)
Rv3913	trxB	4,56E-06	6,231849	Thioredoxin reductase
Rv3914	trxA	9,57E-06	5,473419	Thioredoxin
Rv0141c		5,25E-04	-2,835664	Putative uncharacterized protein
Rv0260c		0,014163	-2,332611	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv0280	ppe3	2,74E-05	-3,321699	Uncharacterized PPE family protein PPE3
Rv0341	iniB	0,018336	-2,735043	ISONIAZID INDUCTIBLE GENE PROTEIN INIB
Rv0692		0,007361	-2,180389	Putative uncharacterized protein
Rv0693	pqqE	0,001219	-2,052768	MoaA/nifB/pqqE family protein
Rv0888		0,00368	-2,537107	Uncharacterized protein Rv0888/MT0911
Rv1184c		0,003157	-2,17816	POSSIBLE EXPORTED PROTEIN
Rv1195	PE13	0,003431	-6,346145	PE FAMILY PROTEIN
Rv1196	PPE18	5,33E-05	-3,104862	PPE FAMILY PROTEIN
Rv1361c	PPE60///ppe19	0,001044	-2,630264	PE FAMILY PROTEIN///Uncharacterized PPE family protein PPE19
Rv1386	PE15	2,33E-04	-2,302652	Uncharacterized PE family protein PE15
Rv1592c		0,006423	-2,057412	Putative uncharacterized protein
Rv1884c	rpfC	0,001033	-2,015705	PROBABLE RESUSCITATION- PROMOTING FACTOR RPFC
Rv2058c	rpmB2	8,65E-05	-2,646696	50S ribosomal protein L28-2
Rv2990c		3,65E-05	-3,088081	Putative uncharacterized protein
Rv3065	mmr	0,003688	-2,606496	Multidrug resistance protein mmr

Rv3066		3,44E-04	-2,728145	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY DEOR-FAMILY)
Rv3354		0,006024	-2,186584	Putative uncharacterized protein
Rv3390	lpqD	3,35E-04	-2,118103	PROBABLE CONSERVED LIPOPROTEIN LPQD
Rv3477	PE31	0,005861	-2,48542	PE FAMILY PROTEIN
Rv3613c		0,010228	2,335094	Putative uncharacterized protein
Rv3614c		0,036922	-2,029145	Putative uncharacterized protein
Rv3616c		0,030429	-2,114335	CONSERVED HYPOTHETICAL ALANINE AND GLYCINE RICH PROTEIN
Rv3763	lpqH	0,046775	-2,208297	Lipoprotein lpqH

## APÊNDICE B – Listas dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS06

Lista dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS06, que apresentaram alteração maior que 2 vezes e  $p < 0,05$ . Tratamento realizado em concentração correspondente a 10xMIC, por 4 horas. Sinais negativos indicam redução na expressão gênica.

ID	Nome gene	$p$	Alteração (x)	Descrição
Rv0068c		0,00771136	2,1533928	PROBABLE OXIDOREDUCTASE
Rv0076c		2,11E-05	3,46454	PROBABLE MEMBRANE PROTEIN
Rv0077c		2,06E-07	11,185493	PROBABLE OXIDOREDUCTASE
Rv0135c		4,27E-07	4,8460226	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv0136	cyp138	1,11E-07	17,14715	Putative cytochrome P450 138
Rv0140		8,82E-07	17,63593	Putative uncharacterized protein
Rv0142		4,26E-06	6,5574493	Putative uncharacterized protein
Rv0146		3,66E-05	3,3791537	Putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase Rv0146
Rv0190		5,40E-06	3,0584326	Putative uncharacterized protein
Rv0244c	fadE5	0,00268949	2,1009676	Acyl-CoA dehydrogenase
Rv0250c		4,81E-04	2,4905028	Putative uncharacterized protein
Rv0251c	hsp	2,68E-07	13,720287	HEAT SHOCK PROTEIN HSP (HEAT-STRESS-INDUCED RIBOSOME-BINDING PROTEIN A)
Rv0303		3,69E-05	2,4266279	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv0324		5,40E-05	2,2694645	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (POSSIBLY ARSR-FAMILY)
Rv0325		4,71E-05	2,1856518	Putative uncharacterized protein
Rv0327c	CYP135A1	3,51E-07	11,092641	Putative cytochrome P450 135A1
Rv0328		5,32E-05	2,4009283	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (POSSIBLY TETR/ACRR-

				FAMILY)
Rv0331		0,0024167	2,0610704	POSSIBLE DEHYDROGENASE/REDUCTASE
Rv0350	dnaK	6,49E-05	2,8758886	Chaperone protein dnaK
Rv0351	grpE	1,86E-04	3,4715528	Protein grpE
Rv0352	dnaJ1	1,65E-05	2,9883072	Chaperone protein dnaJ 1
Rv0353	hspR	1,13E-05	3,1531088	PROBABLE HEAT SHOCK PROTEIN TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR HSPR (MERR FAMILY)
Rv0384c	clpB	2,94E-06	10,759112	Chaperone protein clpB
Rv0426c		0,00156163	2,0172806	POSSIBLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv0436c	pssA	7,60E-04	2,2669873	CDP-diacylglycerol--serine O- phosphatidyltransferase
Rv0452		4,94E-06	3,8455663	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv0465c		1,06E-04	2,180908	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv0465c/MT0481
Rv0467	icl	1,55E-05	4,2311893	Isocitrate lyase
Rv0563	htpX	1,03E-04	2,3718393	Probable protease htpX homolog
Rv0676c	mmpL5	1,53E-07	7,9180193	Putative membrane protein mmpL5
Rv0677c	mmpS5	8,85E-06	4,7490373	Putative membrane protein mmpS5
Rv0678		3,42E-04	7,1112323	Putative uncharacterized protein
Rv0687		5,55E-05	2,4944928	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv0711	atsA	8,87E-04	2,4311917	POSSIBLE ARYLSULFATASE ATSA (ARYL-SULFATE SULPHOHYDROLASE) (ARYLSULPHATASE)
Rv0726c		1,03E-04	2,393613	Putative S-adenosyl-L-methionine- dependent methyltransferase Rv0726c/MT0751
Rv0752c	fadE9	1,39E-04	2,6848605	Acyl-CoA dehydrogenase
Rv0753c	mmsA	0,00135072	2,609516	PROBABLE METHYLMALONATE- SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE MMSA (METHYLMALONIC ACID SEMIALDEHYDE

				DEHYDROGENASE) (MMSDH)
Rv0754	PE_PGRS11	0,00168657	2,3042538	PE-PGRS FAMILY PROTEIN
Rv0789c		1,68E-04	2,4023533	Putative uncharacterized protein
Rv0790c		2,36E-07	6,8393955	Putative uncharacterized protein
Rv0791c		2,36E-07	8,837402	Putative uncharacterized protein
Rv0792c		4,67E-07	8,537991	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY GNTR-FAMILY)
Rv0793		2,06E-07	7,61897	Putative uncharacterized protein
Rv0794c		4,95E-05	2,6843555	PROBABLE OXIDOREDUCTASE
Rv0814c	sseC1	0,00152016	2,5076983	Putative uncharacterized protein
Rv0816c	thiX	7,30E-06	4,366141	PROBABLE THIOREDOXIN THIX
Rv0826		1,12E-04	2,3077679	Putative uncharacterized protein
Rv0830		2,49E-05	2,757746	Putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase Rv0830/MT0851
Rv0846c		2,24E-05	3,338829	Copper-binding protein, putative
Rv0847	lpqS	2,68E-05	4,6203346	PROBABLE LIPOPROTEIN LPQS
Rv0848	cysK2	1,02E-05	4,607044	POSSIBLE CYSTEINE SYNTHASE A CYSK2 (O-ACETYL SERINE SULFHYDRYLASE) (O-ACETYL SERINE (THIOL)-LYASE) (CSASE)
Rv0849		2,13E-05	3,5039983	PROBABLE CONSERVED INTEGRAL MEMBRANE TRANSPORT PROTEIN
Rv0850		1,21E-04	2,9012642	IS1606', transposase
Rv0921		1,07E-06	4,1175914	IS1535, resolvase
Rv0922		0,00281205	2,067655	IS1535, transposase
Rv0990c		1,89E-04	2,2980895	Putative uncharacterized protein
Rv1039c	ppe15	3,10E-05	4,926359	Uncharacterized PPE family protein PPE15
Rv1129c		2,06E-07	12,454172	DNA-binding protein, putative
Rv1130		3,01E-07	13,300668	MmgE/PrpD family protein
Rv1131	gltA1	4,27E-07	12,790041	Citrate synthase
Rv1132		1,17E-04	2,5988383	CONSERVED MEMBRANE PROTEIN

Rv1216c		5,03E-07	6,5838704	PROBABLE CONSERVED INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN
Rv1217c		5,03E-07	13,082768	PROBABLE TETRONASIN-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER
Rv1218c		1,53E-07	13,067222	PROBABLE TETRONASIN-TRANSPORT ATP-BINDING PROTEIN ABC TRANSPORTER
Rv1219c		5,03E-07	11,095785	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv1221	sigE	9,38E-07	4,390282	ALTERNATIVE RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR SIGE
Rv1265		0,00923635	2,0319831	Uncharacterized protein Rv1265/MT1303
Rv1334		1,31E-06	6,2043233	Uncharacterized protein Rv1334/MT1376
Rv1335	cfp10A	9,50E-07	7,247471	9.5 kDa culture filtrate antigen cfp10A
Rv1336	cysM	3,45E-06	4,3353186	Cysteine synthase B
Rv1342c		1,46E-04	2,2964492	Uncharacterized protein Rv1342c/MT1383
Rv1395		4,08E-06	5,392296	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv1395/MT1440
Rv1471	trx-2	2,06E-07	13,22894	PROBABLE THIOREDOXIN TRXB1
Rv1472	echA12	1,86E-05	4,629411	Probable enoyl-CoA hydratase echA12
Rv1528c	papA4	2,87E-07	11,959552	PROBABLE CONSERVED POLYKETIDE SYNTHASE ASSOCIATED PROTEIN PAPA4
Rv1557	mmpL6	3,17E-07	6,5319123	Putative membrane protein mmpL6
Rv1585c		1,35E-04	3,6160173	Possible phage phiRv1 protein
Rv1586c		0,00609319	2,5819106	Probable phiRv1 integrase///Partial REP13E12 repeat protein
Rv1652	argC	6,84E-05	3,1847405	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
Rv1653	argJ	1,94E-05	3,4589577	Arginine biosynthesis bifunctional protein argJ
Rv1654	argB	6,81E-05	3,8489032	Acetylglutamate kinase
Rv1655	argD	6,68E-05	3,6158643	Acetylornithine aminotransferase

Rv1656	argF	1,63E-05	3,6597972	Ornithine carbamoyltransferase
Rv1657	argR	3,10E-05	3,9151673	Arginine repressor
Rv1658	argG	9,78E-05	2,720654	Argininosuccinate synthase
Rv1659	argH	7,91E-04	2,4936233	Argininosuccinate lyase
Rv1673c		1,94E-05	3,1386843	Putative uncharacterized protein
Rv1674c		2,27E-05	4,177236	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv1766		6,79E-06	6,406861	Putative uncharacterized protein
Rv1767		1,53E-07	20,814672	Putative uncharacterized protein
Rv1801	ppe29	6,84E-07	8,699728	Uncharacterized PPE family protein PPE29
Rv1874		6,65E-06	3,1861906	Putative uncharacterized protein
Rv1875		6,86E-07	5,285582	Putative uncharacterized protein
Rv1908c	katG	3,12E-04	3,6481187	Catalase-peroxidase
Rv1909c	fur	2,92E-04	2,9833019	Ferric uptake regulation protein
Rv1954c		0,00152185	2,3712537	Putative uncharacterized protein Rv1954c/MT2003.1///Putative uncharacterized protein
Rv1955		0,00282803	2,3241446	Putative uncharacterized protein
Rv1992c	ctpG	1,58E-06	9,820339	Probable cation-transporting ATPase G
Rv1993c		2,27E-05	11,812714	Uncharacterized protein Rv1993c/MT2049
Rv1994c	cmtR	1,39E-05	11,766318	HTH-type transcriptional regulator cmtR
Rv2011c		5,35E-04	2,1019301	Uncharacterized protein Rv2011c/MT2066
Rv2050		2,74E-04	2,3641965	Putative uncharacterized protein
Rv2052c		0,00212301	2,3026023	Putative uncharacterized protein
Rv2053c		2,74E-04	2,9083593	PROBABLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv2204c		8,66E-07	4,4451137	Protein Rv2204c/MT2260
Rv2225	panB	4,55E-05	2,723614	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase
Rv2372c	rsmE	0,00101227	2,140344	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E
Rv2397c	cysA	8,40E-06	5,091918	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein cysA
Rv2398c	cysW	5,55E-05	5,658917	PROBABLE SULFATE-

				TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYSW
Rv2399c	cysT	1,41E-04	3,9041164	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYST
Rv2400c	subI	3,78E-05	3,7545044	PROBABLE SULFATE-BINDING LIPOPROTEIN SUBI
Rv2453c	mobA	9,06E-05	2,3325872	Probable molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A
Rv2454c		3,27E-05	2,3048267	PROBABLE OXIDOREDUCTASE (BETA SUBUNIT)
Rv2465c	rpiB	1,96E-06	6,064809	Ribose-5-phosphate isomerase B
Rv2466c		1,11E-07	17,67872	Putative uncharacterized protein
Rv2590	fadD9	1,16E-04	2,7243922	PROBABLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD9 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv2601.1		0,00242815	2,444787	Putative uncharacterized protein
Rv2602		2,54E-04	2,5495403	Putative uncharacterized protein
Rv2640c		1,53E-07	7,274466	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv2641	cadI	2,66E-07	17,005575	Cadmium-induced protein cadI
Rv2642		7,18E-06	13,17978	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv2643	arsC	6,41E-05	6,691233	Arsenical resistance protein/arsenate reductase
Rv2667		5,44E-04	2,1002007	Uncharacterized protein Rv2667/MT2741
Rv2693c		4,34E-04	2,2155266	PROBABLE CONSERVED INTEGRAL MEMBRANE ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv2694c		2,87E-05	2,440571	Putative uncharacterized protein
Rv2699c		8,85E-06	3,5172076	Putative uncharacterized protein
Rv2707		4,00E-05	2,2419333	PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv2710	mysB	8,77E-05	2,5855386	RNA polymerase sigma factor

Rv2743c		1,24E-04	2,1347857	POSSIBLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE RICH PROTEIN
Rv2744c		9,11E-04	2,0007207	35 kDa protein
Rv2745c		3,19E-06	3,419847	DNA-binding protein, putative
Rv2963		1,60E-04	3,0522907	PROBABLE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN
Rv3017c	esxQ	3,26E-05	2,765692	ESAT-6-like protein esxQ
Rv3048c	nrdF2	0,02887337	2,1917057	RIBONUCLEOSIDE- DIPHOSPHATE REDUCTASE (BETA CHAIN) NRDF2 (RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE SMALL SUBUNIT) (R2F PROTEIN)
Rv3054c		8,05E-10	106,59932	Putative uncharacterized protein
Rv3060c		3,50E-05	3,4606657	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY GNTR-FAMILY)
Rv3061c	fadE22	6,49E-05	2,974905	Acyl-CoA dehydrogenase, putative
Rv3082c	virS	2,66E-07	6,089566	Putative virulence-regulating 38 kDa protein
Rv3119	moaE1	0,00185976	2,6537406	Molybdopterin-converting factor subunit 2 1
Rv3120		6,81E-05	2,1922314	Putative uncharacterized protein
Rv3159c	PPE53	0,00224939	2,380952	PPE FAMILY PROTEIN
Rv3160c		1,63E-05	5,308035	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY TETR-FAMILY)
Rv3161c		8,63E-06	9,1522	POSSIBLE DIOXYGENASE
Rv3173c		2,27E-05	4,6462855	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY TETR/ACRR- FAMILY)
Rv3174		1,16E-07	16,568556	Oxidoreductase
Rv3175		5,03E-07	7,740038	POSSIBLE AMIDASE (AMINOHYDROLASE)
Rv3176c	mesT	3,72E-06	6,320708	PROBABLE EPOXIDE HYDROLASE MEST (EPOXIDE HYDRATASE) (ARENE-OXIDE HYDRATASE)
Rv3177		4,62E-06	6,557014	POSSIBLE PEROXIDASE (NON- HAEM PEROXIDASE)

Rv3205c		1,78E-05	2,5372825	Putative uncharacterized protein
Rv3206c	moeB1	1,53E-07	9,954614	HesA/MoeB/ThiF family protein
Rv3221.1		2,41E-07	8,035144	POSSIBLE ANTI-SIGMA FACTOR
Rv3222c		2,36E-07	7,163305	Putative uncharacterized protein
Rv3223c	rpoE	5,03E-07	6,1812363	RNA polymerase sigma-E factor
Rv3229c		2,82E-04	6,1802	Linoleoyl-CoA desaturase, putative
Rv3230c		6,72E-04	3,9831991	HYPOTHETICAL OXIDOREDUCTASE
Rv3241c		0,00672929	2,045567	Putative uncharacterized protein
Rv3269	IrpA	5,93E-06	3,5383973	Putative uncharacterized protein
Rv3270	ctpC	1,53E-07	7,605894	Probable cation-transporting P-type ATPase C
Rv3334		0,01664409	2,3260205	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY MERR-FAMILY)
Rv3463		1,50E-07	30,38546	Putative uncharacterized protein
Rv3464	rmlB	2,27E-05	3,4841914	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
Rv3535c	mhpF	5,75E-04	2,2177207	Acetaldehyde dehydrogenase
Rv3547		6,07E-04	2,0806184	Putative uncharacterized protein
Rv3562	fadE31	8,64E-04	2,1543534	Acyl-CoA dehydrogenase, putative
Rv3596c	clpC	8,71E-05	2,0013208	Probable ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
Rv3600c	coaX	1,21E-04	2,3827848	Type III pantothenate kinase
Rv3601c	panD	0,00111299	2,2178166	Aspartate 1-decarboxylase
Rv3602c	panC	1,02E-05	2,8825502	Pantothenate synthetase
Rv3603c		2,63E-04	2,2151892	CONSERVED HYPOTHETICAL ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv3765c		3,47E-04	2,3786523	PROBABLE TWO COMPONENT TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3767c		9,78E-05	3,4655716	Putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase Rv3767c/MT3874
Rv3825c	pks2	0,00337234	2,181933	Phthioceranic/hydroxyphthioceranic acid synthase
Rv3833		6,84E-05	4,0787706	TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN

				(PROBABLY ARAC-FAMILY)
Rv3837c		5,53E-05	2,17766	PROBABLE PHOSPHOGLYCERATE MUTASE (PHOSPHOGLYCEROMUTASE) (PHOSPHOGLYCERATE PHOSPHOMUTASE)
Rv3913	trxB	8,72E-07	6,717766	Thioredoxin reductase
Rv3914	trxA	1,76E-06	6,374698	Thioredoxin
<b>Rv0032</b>	bioF2	2,71E-05	-2,5079367	Aminotransferase, class II
Rv0033	acpA	9,59E-06	-2,7439542	Acyl carrier protein
Rv0034		5,17E-05	-2,3241956	Uncharacterized protein Rv0034/MT0039
Rv0035	fadD34	8,57E-05	-2,091021	AMP-binding family protein
Rv0058	dnaB	0,00127724	-2,145035	Replicative DNA helicase
Rv0059		0,00102996	-2,035697	Putative uncharacterized protein
Rv0096	ppe1	4,97E-04	-3,0884	Uncharacterized PPE family protein PPE1
Rv0098		3,97E-05	-2,4602792	Uncharacterized protein Rv0098/MT0107
Rv0099	fadD10	0,00158916	-2,3611424	POSSIBLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD10 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv0100		8,21E-04	-2,05008	Uncharacterized protein Rv0100/MT0109
Rv0106		4,99E-05	-2,6060543	Uncharacterized protein Rv0106/MT0115
Rv0141c		1,16E-04	-3,0551038	Putative uncharacterized protein
Rv0165c		7,53E-04	-2,1963084	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY GNTR-FAMILY)
Rv0166	fadD5	1,03E-04	-3,6957562	PROBABLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD5 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv0167	yrbE1A	2,87E-05	-4,1334534	CONSERVED HYPOTHETICAL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN YRBE1A
Rv0168	yrbE1B	1,69E-05	-3,8881373	CONSERVED HYPOTHETICAL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN YRBE1B
Rv0169	mce1A	5,90E-05	-4,2925706	MCE-FAMILY PROTEIN MCE1A

Rv0170	mce1B	2,59E-04	-2,1655443	MCE-FAMILY PROTEIN MCE1B
Rv0171	mce1C	1,75E-04	-2,2139752	MCE-FAMILY PROTEIN MCE1C
Rv0172	mce1D	2,12E-04	-2,33022	MCE-FAMILY PROTEIN MCE1D
Rv0173	lprK	6,68E-04	-2,2134786	POSSIBLE MCE-FAMILY LIPOPROTEIN LPRK (MCE-FAMILY LIPOPROTEIN MCE1E)
Rv0260c		0,00212301	-2,604857	POSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv0280	ppe3	3,17E-07	-6,8692746	Uncharacterized PPE family protein PPE3
Rv0282		3,13E-05	-2,826572	Uncharacterized protein Rv0282/MT0295
Rv0283		1,73E-04	-2,9573233	POSSIBLE CONSERVED MEMBRANE PROTEIN
Rv0284		6,29E-05	-3,2414458	POSSIBLE CONSERVED MEMBRANE PROTEIN
Rv0285	PE5	6,72E-05	-3,3062649	PE FAMILY PROTEIN
Rv0286	ppe4	2,06E-04	-2,7408972	Uncharacterized PPE family protein PPE4
Rv0287	esxG	0,00121109	-3,2454894	PE family protein
Rv0288	esxH	6,70E-04	-2,679386	ESAT-6-like protein esxH
Rv0289		7,05E-04	-2,331389	Putative uncharacterized protein
Rv0290		0,00122664	-2,2766411	PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv0291	mycP3	1,20E-04	-2,4655929	PROBABLE MEMBRANE-ANCHORED MYCOSIN MYCP3 (SERINE PROTEASE) (SUBTILISIN-LIKE PROTEASE) (SUBTILASE-LIKE) (MYCOSIN-3)
Rv0292		1,35E-04	-2,4770234	PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv0312		3,09E-04	-2,111721	CONSERVED HYPOTHETICAL PROLINE AND THREONINE RICH PROTEIN
Rv0315		1,33E-04	-2,127958	POSSIBLE BETA-1,3-GLUCANASE
Rv0316		0,00122664	-2,2148666	Muconolactone isomerase, putative
Rv0404	fadD30	0,0174113	-2,112989	Acyl-CoA synthase
Rv0447c	ufaA1	0,00208433	-2,4260187	PROBABLE CYCLOPROPANE-FATTY-ACYL-PHOSPHOLIPID SYNTHASE UFAA1

				(CYCLOPROPANE FATTY ACID SYNTHASE) (CFA SYNTHASE)
Rv0448c		0,0155223	-3,101818	Putative uncharacterized protein
Rv0449c		0,0447184	-3,2487125	Putative uncharacterized protein
Rv0482	murB	0,00273274	-2,0571032	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase
Rv0696		5,75E-04	-2,0525746	Glycosyl transferase
Rv0867c	rpfA	0,0054037	-2,0441396	POSSIBLE RESUSCITATION-PROMOTING FACTOR RPF A
Rv0887c		0,0021829	-2,2706456	Uncharacterized protein Rv0887c/MT0910
Rv0888		3,91E-06	-6,3297644	Uncharacterized protein Rv0888/MT0911
Rv0892		0,01786763	-2,224667	Uncharacterized monooxygenase Rv0892/MT0916
Rv0933	pstB2	0,01187918	-2,0029478	Phosphate import ATP-binding protein pstB 2
Rv0934	pstS1	0,00310775	-2,2876685	Phosphate-binding protein pstS 1
Rv0935	pstC1	5,75E-04	-2,320423	Phosphate transport system permease protein pstC 1
Rv1196	PPE18	7,28E-04	-2,2234466	PPE FAMILY PROTEIN
Rv1349		2,01E-04	-3,2110877	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein Rv1349/MT1392
Rv1361c	PPE60//ppe19	2,27E-05	-3,6795316	PE FAMILY PROTEIN//Uncharacterized PPE family protein PPE19
Rv1386	PE15	4,22E-07	-8,7467785	Uncharacterized PE family protein PE15
Rv1387	ppe20	2,10E-06	-7,079666	Uncharacterized PPE family protein PPE20
Rv1456c		9,39E-04	-2,0127406	PROBABLE UNIDENTIFIED ANTIBIOTIC-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE ABC TRANSPORTER
Rv1507c		0,04510957	-2,0069063	Uncharacterized protein Rv1507c/MT1555
Rv1519		7,73E-04	-2,7410445	Uncharacterized protein Rv1519/MT1569
Rv1535		5,42E-04	-3,100602	Putative uncharacterized protein
Rv1549	fadD11	0,01015284	-2,3718717	Putative fatty-acid--CoA ligase fadD11//Uncharacterized protein Rv1549/MT1599.1

Rv1592c		0,00357491	-2,0203223	Putative uncharacterized protein
Rv1622c	cydB	0,01180333	-2,3101754	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II
Rv1623c	cydA	0,01870148	-2,2143075	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I
Rv1690	lprJ	0,00118539	-2,10919	PROBABLE LIPOPROTEIN LPRJ
Rv1734c		7,48E-05	-2,4600728	Putative uncharacterized protein
Rv1754c		0,00889608	-2,0022573	Putative uncharacterized protein
Rv1806	PE20	0,02022349	-2,9940872	PE FAMILY PROTEIN
Rv1807	PPE31	0,03437432	-3,3647225	PPE FAMILY PROTEIN
Rv1815		3,87E-06	-3,2567892	Uncharacterized protein Rv1815/MT1863
Rv1884c	rpfC	5,03E-07	-7,901565	PROBABLE RESUSCITATION-PROMOTING FACTOR RPF C
Rv1918c	PPE35	7,60E-04	-2,0314367	PPE FAMILY PROTEIN
Rv2058c	rpmB2	1,02E-05	-3,7660267	50S ribosomal protein L28-2
Rv2069	sigC	4,18E-04	-3,0098903	Probable RNA polymerase sigma-C factor
Rv2075c		3,11E-04	-2,0841987	Uncharacterized protein Rv2075c/MT2135
Rv2190c		0,00789985	-2,1948326	Uncharacterized protein Rv2190c/MT2245
Rv2253		1,75E-04	-2,084676	Putative uncharacterized protein
Rv2275		6,68E-04	-2,0390244	Putative uncharacterized protein
Rv2276	cyp121	9,78E-05	-2,5659413	Cytochrome P450 121
Rv2377c	mbtH	0,0019148	-2,564568	Protein mbtH
Rv2378c	mbtG	0,00339222	-2,0771823	L-lysine 6-monooxygenase mbtG
Rv2379c	mbtF	0,00230995	-2,3681412	PEPTIDE SYNTHETASE MBTF (PEPTIDE SYNTHASE)
Rv2380c	mbtE	0,00155803	-2,7665772	PEPTIDE SYNTHETASE MBTE (PEPTIDE SYNTHASE)
Rv2381c	mbtD	3,39E-04	-3,2791343	POLYKETIDE SYNTHETASE MBTD (POLYKETIDE SYNTHASE)
Rv2382c	mbtC	0,00148815	-2,8909817	POLYKETIDE SYNTHETASE MBTC (POLYKETIDE SYNTHASE)
Rv2383c	mbtB	0,00104084	-2,947837	Phenylloxazoline synthase mbtB
Rv2384	mbtA	0,00396765	-2,0758724	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase

Rv2386c	mbtI	8,78E-04	-3,8894827	Isochorismate synthase/isochorismate-pyruvate lyase mbtI
Rv2503c	scoB	0,00601081	-2,4543917	Probable succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B
Rv2504c	scoA	0,04425211	-2,576586	Probable succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A
Rv2563		3,69E-05	-2,573905	Uncharacterized ABC transporter permease Rv2563/MT2639
Rv2564		2,27E-05	-2,6331027	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein Rv2564/MT2640
Rv2645		0,00650637	-2,079584	Uncharacterized protein Rv2645/MT2723
Rv2787		5,80E-04	-2,0299573	CONSERVED HYPOTHETICAL ALANINE RICH PROTEIN
Rv2874	dipZ	0,02963288	-2,185294	Protein dipZ
Rv2913c		0,0027871	-2,2241633	Uncharacterized protein Rv2913c/MT2981
Rv2917		8,56E-04	-2,597635	Uncharacterized protein Rv2917/MT2985
Rv2940c	mas	0,00193544	-2,3833363	Mycocerosic acid synthase
Rv2945c	lppX	0,00133268	-2,14605	Putative lipoprotein lppX
Rv2946c	pksl	8,46E-04	-2,4465814	PROBABLE POLYKETIDE SYNTHASE PKS1
Rv2947c	pksl5	6,72E-04	-2,4093769	PROBABLE POLYKETIDE SYNTHASE PKS15
Rv2948c	fadD22	0,00573919	-2,7925136	PROBABLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD22 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv2949c		0,00409489	-2,4402664	Chorismate--pyruvate lyase
Rv2950c	fadD29	0,00989874	-2,2987294	PROBABLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD29 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv2952		0,00161368	-2,1148393	Phthiotriol/phenolphthiotriol dimycocerosates methyltransferase
Rv2958c		0,00234658	-2,9752245	PGL/p-HBAD biosynthesis glycosyltransferase Rv2958c/MT3034
Rv2959c		0,00203047	-3,2174332	Rhamnosyl O-methyltransferase
Rv2960c		0,01508586	-2,0757678	Putative uncharacterized protein

Rv2990c		1,53E-07	-8,73869	Putative uncharacterized protein
Rv3022A	PE29	4,90E-04	-2,3324695	PE FAMILY PROTEIN
Rv3135	ppe50	0,00229742	-3,074268	Uncharacterized PPE family protein PPE50
Rv3136	ppe51	1,35E-04	-2,975605	Uncharacterized PPE family protein PPE51
Rv3289c		3,17E-07	-6,209686	POSSIBLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv3290c	lat	2,83E-07	-9,109881	Probable L-lysine-epsilon aminotransferase
Rv3354		0,00141654	-2,0186164	Putative uncharacterized protein
Rv3402c		7,73E-04	-2,4380646	Protein Rv3402c/MT3510
Rv3477	PE31	6,88E-06	-5,4922886	PE FAMILY PROTEIN
Rv3478	PPE60	0,00282803	-3,8310735	PE FAMILY PROTEIN
Rv3479		7,28E-04	-2,0511825	POSSIBLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv3487c	lipF	0,00129015	-2,300228	PROBABLE ESTERASE/LIPASE LIPF
Rv3613c		4,16E-04	-3,219308	Putative uncharacterized protein
Rv3614c		0,00985745	-2,1438377	Putative uncharacterized protein
Rv3615c		0,02901144	-2,0411017	Uncharacterized protein Rv3615c/MT3717
Rv3739c	PPE67	8,77E-05	-2,92033	PPE FAMILY PROTEIN
Rv3763	lpqH	0,02297619	-2,1724067	Lipoprotein lpqH
Rv3922c		0,00358577	-2,0654116	UPF0161 protein Rv3922c/MT4040.1
Rv3923c	rnxA	0,01188026	-2,0631104	Ribonuclease P protein component

### APÊNDICE C – Listas dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS07

Lista dos genes diferencialmente expressos após tratamento com LS07, que apresentaram alteração maior que 2 vezes e  $p < 0,05$ . Tratamento realizado em concentração correspondente a 10xMIC, por 4 horas. Sinais negativos indicam redução na expressão gênica.

ID	Nome gene	$p$	Alteração (x)	Descrição
Rv0140		1,83E-06	25,16291	Putative uncharacterized protein
Rv0142		1,00E-07	21,92636	Putative uncharacterized protein
Rv0190		5,63E-05	2,41096	Putative uncharacterized protein
Rv0194		2,04E-04	2,574244	PROBABLE DRUGS-TRANSPORT TRANSMEMBRANE ATP-BINDING PROTEIN ABC TRANSPORTER
Rv0196		6,30E-06	9,189885	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv0196/MT0206
Rv0197		4,78E-06	5,629524	POSSIBLE OXIDOREDUCTASE
Rv0250c		8,73E-05	4,174882	Putative uncharacterized protein
Rv0251c	hsp	1,08E-06	21,49948	HEAT SHOCK PROTEIN HSP (HEAT-STRESS-INDUCED RIBOSOME-BINDING PROTEIN A)
Rv0303		5,20E-06	4,098795	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv0307c		1,23E-04	2,458477	Putative uncharacterized protein
Rv0319	pcp	2,42E-04	2,061967	Pyrrolidone-carboxylate peptidase
Rv0323c		6,20E-06	3,760868	Putative uncharacterized protein
Rv0324		2,06E-07	6,708815	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL

				REGULATORY PROTEIN (POSSIBLY ARSR-FAMILY)
Rv0325		1,99E-07	6,102649	Putative uncharacterized protein
Rv0326		2,55E-05	3,787016	Putative uncharacterized protein
Rv0327c	CYP135A1	2,15E-08	44,88158	Putative cytochrome P450 135A1
Rv0328		4,38E-07	6,832593	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (POSSIBLY TETR/ACRR-FAMILY)
Rv0331		2,37E-07	9,948267	POSSIBLE DEHYDROGENASE/REDUCTASE
Rv0332		1,73E-05	3,657214	Putative uncharacterized protein
Rv0350	dnaK	1,06E-04	2,962381	Chaperone protein dnaK
Rv0351	grpE	1,90E-04	3,902988	Protein grpE
Rv0352	dnaJ1	4,78E-06	4,291253	Chaperone protein dnaJ 1
Rv0353	hspR	1,64E-06	4,180697	PROBABLE HEAT SHOCK PROTEIN TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR HSPR (MERR FAMILY)
Rv0354c	PPE7	6,20E-06	3,099336	PPE FAMILY PROTEIN
Rv0384c	clpB	1,03E-06	18,53967	Chaperone protein clpB
Rv0407	fgd1	8,19E-05	2,291638	Glucose-6-phosphate dehydrogenase, F420-dependent
Rv0408	pta	6,48E-04	2,198649	Phosphate acetyltransferase
Rv0436c	pssA	6,64E-06	4,052963	CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase
Rv0563	htpX	2,87E-05	2,559028	Probable protease htpX homolog
Rv0623		3,15E-05	3,191951	Putative uncharacterized protein
Rv0624		1,03E-05	2,771967	UPF0110 protein Rv0624/MT0652
Rv0656c		6,38E-04	2,220709	Putative uncharacterized protein
Rv0687		2,20E-07	5,392705	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase

				family
Rv0688		0,0012	2,185123	PUTATIVE FERREDOXIN REDUCTASE
Rv0711	atsA	1,30E-05	3,240854	POSSIBLE ARYLSULFATASE ATSA (ARYL-SULFATE SULPHOHYDROLASE) (ARYLSULPHATASE)
Rv0729	xylB	9,78E-05	2,053047	Carbohydrate kinase, FGGY family
Rv0742	PE_PGRS8	0,001311	2,033829	PE-PGRS FAMILY PROTEIN
Rv0743c		5,25E-05	2,28336	Putative uncharacterized protein
Rv0744c		7,54E-05	2,236966	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv0759c		4,58E-06	3,931671	Uncharacterized HIT-like protein Rv0759c/MT0784
Rv0762c		2,63E-06	3,689937	Putative uncharacterized protein
Rv0763c		1,09E-06	4,401784	POSSIBLE FERREDOXIN
Rv0764c	cyp51	5,40E-06	4,598853	Lanosterol 14-alpha demethylase
Rv0765c		4,97E-06	5,575314	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv0766c	cyp123	2,48E-06	3,938932	Putative cytochrome P450 123
Rv0767c		2,29E-05	5,9596	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv0767c/MT0791
Rv0768	aldA	6,53E-07	4,531529	Aldehyde dehydrogenase
Rv0769		1,32E-05	3,87878	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv0770		2,77E-06	3,219705	Uncharacterized oxidoreductase Rv0770/MT0794
Rv0771		1,51E-05	2,797158	POSSIBLE 4-CARBOXYMUCONOLACT ONE DECARBOXYLASE (CMD)
Rv0789c		3,74E-04	2,307255	Putative uncharacterized protein
Rv0790c		3,73E-07	6,305496	Putative uncharacterized

				protein
Rv0791c		3,03E-07	7,614816	Putative uncharacterized protein
Rv0792c		1,00E-07	8,881877	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY GNTR-FAMILY)
Rv0793		7,22E-08	11,2946	Putative uncharacterized protein
Rv0794c		7,57E-07	6,439002	PROBABLE OXIDOREDUCTASE
Rv0813c		3,01E-04	2,095448	UPF0678 fatty acid-binding protein-like protein Rv0813c/MT0834
Rv0814c	sseC1	5,51E-05	4,511105	Putative uncharacterized protein
Rv0815c	cysA1	3,74E-04	2,253625	Putative thiosulfate sulfurtransferase
Rv0816c	thiX	3,19E-08	18,53823	PROBABLE THIOREDOXIN THIX
Rv0826		6,10E-04	2,139023	Putative uncharacterized protein
Rv0841		3,23E-05	2,918468	PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv0846c		1,81E-04	2,979443	Copper-binding protein, putative
Rv0847	lpqS	2,46E-04	5,056107	PROBABLE LIPOPROTEIN LPQS
Rv0848	cysK2	3,78E-05	3,930842	POSSIBLE CYSTEINE SYNTHASE A CYSK2 (O-ACETYL SERINE SULFHYDRYLASE) (O-ACETYL SERINE (THIOL)-LYASE) (CSASE)
Rv0849		2,90E-05	2,902169	PROBABLE CONSERVED INTEGRAL MEMBRANE TRANSPORT PROTEIN
Rv0850		8,84E-04	2,376514	IS1606', transposase
Rv0953c		8,91E-06	3,663685	Uncharacterized protein Rv0953c/MT0980
Rv0967	csor	0,001644	3,40999	Copper-sensing transcriptional repressor csor
Rv0969	ctpV	1,75E-04	3,661241	Probable cation-transporting ATPase V

Rv0980c	PE_PGRS1 8	0,003614	2,178286	PE-PGRS FAMILY PROTEIN
Rv0990c		3,66E-05	4,223899	Putative uncharacterized protein
Rv0991c		4,40E-04	2,529622	CONSERVED HYPOTHETICAL SERINE RICH PROTEIN
Rv1004c		0,001221	2,076851	PROBABLE MEMBRANE PROTEIN
Rv1035c		9,66E-05	2,191129	PROBABLE TRANSPOSASE
Rv1039c	ppe15	5,55E-07	12,26885	Uncharacterized PPE family protein PPE15
Rv1048c		1,81E-06	5,462822	Putative uncharacterized protein
Rv1049		7,37E-09	34,95863	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR PROTEIN
Rv1050		1,96E-08	127,53	PROBABLE OXIDOREDUCTASE
Rv1051c		6,05E-04	3,023767	Putative uncharacterized protein
Rv1052		2,71E-04	2,319664	Putative uncharacterized protein
Rv1066		8,31E-05	2,380037	Putative uncharacterized protein
Rv1129c		3,03E-07	11,61752	DNA-binding protein, putative
Rv1130		1,24E-06	7,577028	MmgE/PrpD family protein
Rv1131	gltA1	5,73E-07	7,58185	Citrate synthase
Rv1132		4,26E-05	2,310355	CONSERVED MEMBRANE PROTEIN
Rv1169c	PE11	0,005466	2,388205	PE FAMILY PROTEIN
Rv1221	sigE	3,75E-06	4,275572	ALTERNATIVE RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR SIGE
Rv1256c	cyp130	1,85E-04	2,022757	Putative cytochrome P450 130
Rv1259		3,66E-06	3,499185	Uncharacterized protein Rv1259/MT1297.1
Rv1265		1,35E-04	4,354558	Uncharacterized protein Rv1265/MT1303
Rv1285	cysD	4,78E-06	6,750344	Sulfate adenylyltransferase subunit 2
Rv1286	cysNC	5,40E-06	5,828642	Bifunctional enzyme cysN/cysC

Rv1287		6,75E-05	3,287032	Putative HTH-type transcriptional regulator Rv1287/MT1325
Rv1296	thrB	0,00173	2,099641	Homoserine kinase
Rv1298	rpmE	2,03E-05	3,069684	50S ribosomal protein L31
Rv1299	prfA	1,46E-06	3,603061	Peptide chain release factor 1
Rv1334		4,03E-08	15,31457	Uncharacterized protein Rv1334/MT1376
Rv1335	cfp10A	2,48E-07	14,21298	9.5 kDa culture filtrate antigen cfp10A
Rv1336	cysM	1,77E-07	9,467375	Cysteine synthase B
Rv1337		2,96E-05	3,156326	Uncharacterized protein Rv1337/MT1378
Rv1338	murI	1,31E-05	3,849313	Glutamate racemase
Rv1342c		7,52E-05	2,684633	Uncharacterized protein Rv1342c/MT1383
Rv1395		1,64E-06	9,085251	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv1395/MT1440
Rv1399c	lipH	3,30E-05	2,449485	Carboxylesterase family protein
Rv1460		6,14E-05	6,190822	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv1461		9,91E-05	5,155227	UPF0051 protein Rv1461/MT1508
Rv1462		1,51E-05	5,567086	UPF0051 protein Rv1462/MT1509
Rv1463		2,90E-05	5,072455	ABC transporter, ATP-binding protein
Rv1464	csd	1,79E-05	5,307617	Probable cysteine desulfurase
Rv1465		4,15E-06	5,78438	Nitrogen fixation protein NifU-related protein
Rv1466		7,71E-06	4,91895	Putative uncharacterized protein
Rv1471	trx-2	1,14E-07	19,43951	PROBABLE THIOREDOXIN TRXB1
Rv1472	echA12	1,46E-07	11,3761	Probable enoyl-CoA hydratase echA12
Rv1473		4,85E-05	2,943003	ABC transporter, ATP-binding protein
Rv1473.1		6,11E-04	2,116148	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN

Rv1528c	papA4	1,14E-07	36,28558	PROBABLE CONSERVED POLYKETIDE SYNTHASE ASSOCIATED PROTEIN PAPA4
Rv1553	frdB	1,23E-04	2,043085	Fumarate reductase iron-sulfur subunit
Rv1554	frdC	6,88E-04	2,022289	Fumarate reductase subunit C
Rv1555	frdD	3,88E-05	2,201529	Fumarate reductase subunit D
Rv1557	mmpL6	9,15E-05	2,10656	Putative membrane protein mmpL6
Rv1585c		4,45E-06	5,313338	Possible phage phiRv1 protein
Rv1586c		4,36E-05	3,802919	Probable phiRv1 integrase//Partial REP13E12 repeat protein
Rv1589	bioB	1,90E-04	2,231564	Biotin synthase
Rv1652	argC	1,89E-05	4,196814	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
Rv1653	argJ	8,54E-06	4,214376	Arginine biosynthesis bifunctional protein argJ
Rv1654	argB	3,19E-05	4,250669	Acetylglutamate kinase
Rv1655	argD	2,84E-05	4,339723	Acetylornithine aminotransferase
Rv1656	argF	8,33E-06	4,381752	Ornithine carbamoyltransferase
Rv1657	argR	1,48E-05	4,431997	Arginine repressor
Rv1658	argG	9,91E-05	2,442712	Argininosuccinate synthase
Rv1659	argH	1,69E-04	2,649145	Argininosuccinate lyase
Rv1673c		7,24E-09	37,98891	Putative uncharacterized protein
Rv1674c		2,63E-08	54,10342	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv1721c		8,75E-05	2,309991	Putative uncharacterized protein
Rv1766		4,78E-06	5,878717	Putative uncharacterized protein
Rv1767		4,10E-08	28,93173	Putative uncharacterized protein
Rv1801	ppe29	1,13E-07	14,7865	Uncharacterized PPE family protein PPE29
Rv1874		2,61E-07	5,288911	Putative uncharacterized protein

Rv1875		4,21E-08	9,598794	Putative uncharacterized protein
Rv1908c	katG	3,79E-05	4,546655	Catalase-peroxidase
Rv1909c	fur	2,71E-06	5,469587	Ferric uptake regulation protein
Rv1992c	ctpG	1,64E-06	11,19691	Probable cation-transporting ATPase G
Rv1993c		2,79E-05	11,8084	Uncharacterized protein Rv1993c/MT2049
Rv1994c	cmtR	1,14E-06	13,26713	HTH-type transcriptional regulator cmtR
Rv2011c		2,34E-07	7,667463	Uncharacterized protein Rv2011c/MT2066
Rv2012		1,07E-06	4,788361	Uncharacterized protein Rv2012/MT2067
Rv2016		6,11E-05	2,687256	Putative uncharacterized protein
Rv2017		1,49E-05	2,538542	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv2050		6,26E-05	2,660314	Putative uncharacterized protein
Rv2052c		3,24E-05	3,100194	Putative uncharacterized protein
Rv2053c		6,11E-05	3,379057	PROBABLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv2202c	adoK	3,25E-04	2,008603	Adenosine kinase
Rv2204c		1,26E-06	4,686734	Protein Rv2204c/MT2260
Rv2308		7,61E-04	2,008856	Uncharacterized protein Rv2308/MT2366
Rv2309.1		5,89E-05	3,87366	Putative uncharacterized protein
Rv2327		9,94E-05	2,423706	Putative uncharacterized protein
Rv2333c		9,26E-06	2,952829	PROBABLE CONSERVED INTEGRAL MEMBRANE TRANSPORT PROTEIN
Rv2335	cysE	7,10E-05	2,090381	PROBABLE SERINE ACETYLTRANSFERASE CYSE (SAT)
Rv2372c	rsmE	8,08E-06	3,52233	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E
Rv2373c	dnaJ2	2,99E-04	2,067378	Chaperone protein dnaJ 2

Rv2391	sir	2,90E-05	3,089846	Sulfite reductase [ferredoxin]
Rv2392	cysH	2,18E-05	3,366901	Probable phosphoadenosine phosphosulfate reductase
Rv2393		8,12E-06	3,460899	Putative uncharacterized protein
Rv2397c	cysA	9,39E-08	9,682267	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein cysA
Rv2398c	cysW	2,82E-06	10,44857	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYSW
Rv2399c	cysT	1,31E-05	6,27841	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYST
Rv2400c	subI	5,35E-07	7,827172	PROBABLE SULFATE-BINDING LIPOPROTEIN SUBI
Rv2405		3,28E-05	2,281161	Putative uncharacterized protein
Rv2452c		0,005647	2,963875	Putative uncharacterized protein
Rv2453c	mobA	1,84E-06	3,493835	Probable molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A
Rv2454c		1,72E-06	3,376276	PROBABLE OXIDOREDUCTASE (BETA SUBUNIT)
Rv2465c	rpiB	6,58E-07	10,61006	Ribose-5-phosphate isomerase B
Rv2466c		9,39E-08	23,93989	Putative uncharacterized protein
Rv2551c		5,65E-05	2,125873	Putative uncharacterized protein
Rv2601.1		1,19E-04	4,055913	Putative uncharacterized protein
Rv2602		3,30E-05	4,022174	Putative uncharacterized protein
Rv2639c		4,71E-05	2,498976	UPF0060 membrane protein Rv2639c/MT2717
Rv2640c		8,45E-08	9,593772	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv2641	cadI	6,58E-07	21,59368	Cadmium-induced protein cadI

Rv2642		2,63E-06	26,72579	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR- FAMILY)
Rv2643	arsC	9,64E-06	17,33262	Arsenical resistance protein/arsenate reductase
Rv2644c		2,14E-05	3,852088	Uncharacterized protein Rv2644c/MT2721.1
Rv2667		1,12E-06	4,506759	Uncharacterized protein Rv2667/MT2741
Rv2693c		1,96E-04	2,359429	PROBABLE CONSERVED INTEGRAL MEMBRANE ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv2694c		1,62E-05	2,649861	Putative uncharacterized protein
Rv2695		7,66E-06	2,682423	CONSERVED HYPOTHETICAL ALANINE RICH PROTEIN
Rv2699c		6,85E-07	6,536027	Putative uncharacterized protein
Rv2707		1,90E-04	2,499141	PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv2710	mysB	5,98E-04	2,311309	RNA polymerase sigma factor
Rv2730		2,94E-04	2,007963	Putative uncharacterized protein
Rv2743c		1,45E-05	2,606349	POSSIBLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE RICH PROTEIN
Rv2744c		6,75E-05	2,615755	35 kDa protein
Rv2745c		2,49E-06	3,984582	DNA-binding protein, putative
Rv2806		2,82E-06	6,0044	POSSIBLE MEMBRANE PROTEIN
Rv2807		0,001927	2,08878	Putative uncharacterized protein
Rv2826c		0,001432	2,221906	Putative uncharacterized protein
Rv2827c		0,008439	2,001428	Putative uncharacterized protein
Rv2863		0,005776	2,142344	Putative uncharacterized protein
Rv2877c		9,79E-05	2,857964	Mercury resistance transport

				protein, putative
Rv2878c	mpt53	3,81E-05	2,742694	Soluble secreted antigen MPT53
Rv2893		1,44E-05	3,33114	Glucose-6-phosphate dehydrogenase, putative
Rv2898c		2,10E-04	2,011741	UPF0102 protein Rv2898c/MT2966
Rv2963		0,001353	3,294942	PROBABLE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN
Rv2987c	leuD	0,001466	2,319877	3-isopropylmalate dehydratase small subunit
Rv2988c	leuC	3,61E-04	2,728196	3-isopropylmalate dehydratase large subunit
Rv3017c	esxQ	9,39E-08	8,419471	ESAT-6-like protein esxQ
Rv3018A	PE27A	0,001419	2,525129	PE FAMILY PROTEIN
Rv3020c	esxS	2,45E-04	3,679359	ESAT-6 LIKE PROTEIN ESXS
Rv3048c	nrdF2	0,01307	2,019487	RIBONUCLEOSIDE- DIPHOSPHATE REDUCTASE (BETA CHAIN) NRDF2 (RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE SMALL SUBUNIT) (R2F PROTEIN)
Rv3054c		1,90E-08	28,34605	Putative uncharacterized protein
Rv3060c		2,14E-05	3,542305	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY GNTR- FAMILY)
Rv3061c	fadE22	4,12E-05	2,369213	Acyl-CoA dehydrogenase, putative
Rv3082c	virS	7,24E-07	5,182108	Putative virulence-regulating 38 kDa protein
Rv3098c		3,70E-04	2,110383	Putative uncharacterized protein
Rv3119	moaE1	4,98E-05	5,336977	Molybdopterin-converting factor subunit 2 1
Rv3120		5,55E-07	4,627119	Putative uncharacterized protein
Rv3121	cyp141	5,74E-05	2,780772	Putative cytochrome P450 141
Rv3172c		3,75E-06	3,949413	Putative uncharacterized protein

Rv3173c		3,66E-07	13,68895	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY TETR/ACRR- FAMILY)
Rv3174		1,38E-09	204,0127	Oxidoreductase
Rv3175		1,38E-09	131,2583	POSSIBLE AMIDASE (AMINOHYDROLASE)
Rv3176c	mesT	4,03E-08	37,60896	PROBABLE EPOXIDE HYDROLASE MEST (EPOXIDE HYDRATASE) (ARENE-OXIDE HYDRATASE)
Rv3177		7,24E-09	164,8613	POSSIBLE PEROXIDASE (NON-HAEM PEROXIDASE)
Rv3178		7,22E-08	21,74399	Putative uncharacterized protein
Rv3205c		1,64E-06	4,038151	Putative uncharacterized protein
Rv3206c	moeB1	9,39E-08	15,28298	HesA/MoeB/ThiF family protein
Rv3221.1		4,10E-08	11,59266	POSSIBLE ANTI-SIGMA FACTOR
Rv3222c		4,03E-08	11,06811	Putative uncharacterized protein
Rv3223c	rpoE	6,36E-08	9,291671	RNA polymerase sigma-E factor
Rv3270	ctpC	3,15E-05	3,228288	Probable cation-transporting P- type ATPase C
Rv3279c	birA	1,81E-04	2,511879	BirA bifunctional protein
Rv3334		7,53E-04	3,866099	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY MERR- FAMILY)
Rv3341	metX	6,06E-04	2,30099	Homoserine O- acetyltransferase
Rv3382c	ispH2	2,45E-04	2,119775	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase 2
Rv3383c	idsB	2,56E-04	2,394276	POSSIBLE POLYPRENYL SYNTHETASE IDSB (POLYPRENYL TRANSFERASE) (POLYPRENYL DIPHOSPHATE SYNTHASE)

Rv3444c	esxT	3,83E-05	2,677007	PUTATIVE ESAT-6 LIKE PROTEIN ESXT
Rv3445c	esxU	1,51E-04	3,078255	ESAT-6 LIKE PROTEIN ESXU
Rv3455c	truA	2,74E-04	2,375315	tRNA pseudouridine synthase A
Rv3458c	rpsD	5,58E-04	2,516686	30S ribosomal protein S4
Rv3459c	rpsK	0,001535	2,242014	30S ribosomal protein S11
Rv3460c	rpsM	1,07E-04	2,441085	30S ribosomal protein S13
Rv3461c	rpmJ	3,82E-05	3,183314	50S ribosomal protein L36
Rv3462c	infA	5,85E-04	2,428676	Translation initiation factor IF-1
Rv3463		5,09E-08	54,02535	Putative uncharacterized protein
Rv3464	rmlB	6,36E-08	7,204863	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
Rv3465	rmlC	1,84E-04	3,0152	dTDP-4-DEHYDRORHAMNOSE 3,5-EPIMERASE RMLC (DTDP-4-KETO-6-DEOXYGLUCOSE 3,5-EPIMERASE) (DTDP-L-RHAMNOSE SYNTHETASE) (THYMIDINE DIPHOSPHO-4-KETO-RHAMNOSE 3,5-EPIMERASE)
Rv3466		0,001322	2,322264	Uncharacterized protein Rv3466/MT3572
Rv3595c	PE_PGRS5 9	1,52E-04	2,572831	PE-PGRS FAMILY PROTEIN
Rv3596c	clpC	1,31E-05	2,675715	Probable ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
Rv3635		1,31E-05	3,445056	PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv3650	PE33	1,32E-05	4,12008	PE FAMILY PROTEIN
Rv3656c		2,80E-06	3,321902	Putative uncharacterized protein
Rv3705.1		1,78E-04	2,474626	CONSERVED HYPOTHETICAL PROLINE RICH PROTEIN
Rv3706c		5,06E-07	10,52473	CONSERVED HYPOTHETICAL PROLINE RICH PROTEIN

Rv3764c		2,57E-05	3,226841	Sensor protein
Rv3765c		6,93E-06	6,133618	PROBABLE TWO COMPONENT TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3833		4,91E-05	4,352712	TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARAC-FAMILY)
Rv3837c		6,18E-06	3,156882	PROBABLE PHOSPHOGLYCERATE MUTASE (PHOSPHOGLYCEROMUTASE) (PHOSPHOGLYCERATE PHOSPHOMUTASE)
Rv3838c	pheA	6,93E-05	2,138596	Prephenate dehydratase
Rv3913	trxB	9,39E-08	14,58664	Thioredoxin reductase
Rv3914	trxA	2,51E-06	9,08291	Thioredoxin
Rv3915		3,12E-05	2,756656	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase-related protein
Rv0032	bioF2	3,78E-05	-2,299578	Aminotransferase, class II
Rv0033	acpA	1,28E-05	-2,498615	Acyl carrier protein
Rv0040c	mtc28	4,27E-04	-2,688462	Proline-rich 28 kDa antigen
Rv0057		6,45E-05	-2,32955	Uncharacterized protein Rv0057/MT0063
Rv0058	dnaB	4,63E-05	-3,153476	Replicative DNA helicase
Rv0059		5,65E-05	-2,450191	Putative uncharacterized protein
Rv0061		8,05E-05	-2,384739	Putative uncharacterized protein
Rv0088		0,002461	-3,058637	Uncharacterized protein Rv0088/MT0096
Rv0089		7,68E-04	-2,220121	Uncharacterized methyltransferase Rv0089/MT0098
Rv0096	ppe1	2,62E-05	-4,237682	Uncharacterized PPE family protein PPE1
Rv0097		1,81E-04	-2,364794	Putative dioxygenase Rv0097/MT0106
Rv0098		1,94E-05	-2,28279	Uncharacterized protein Rv0098/MT0107
Rv0099	fadD10	0,001006	-2,228823	POSSIBLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD10

				(FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv0100		8,73E-05	-2,105001	Uncharacterized protein Rv0100/MT0109
Rv0107c	ctpI	6,75E-05	-2,038164	Probable cation-transporting ATPase I
Rv0108c		4,53E-05	-2,383636	Putative uncharacterized protein
Rv0111		6,11E-04	-2,099174	POSSIBLE TRANSMEMBRANE ACYLTRANSFERASE
Rv0112	gca	5,93E-05	-2,548369	GDP-D-mannose dehydratase, putative
Rv0113	gmhA	8,31E-05	-2,89518	Phosphoheptose isomerase
Rv0114	gmhB	5,65E-05	-2,17429	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase
Rv0129c	fbpC	0,006129	-2,774967	Antigen 85-C
Rv0141c		0,001656	-4,237337	Putative uncharacterized protein
Rv0166	fadD5	4,53E-05	-3,327161	PROBABLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD5 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv0167	yrbE1A	6,14E-05	-2,646882	CONSERVED HYPOTHETICAL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN YRBE1A
Rv0168	yrbE1B	1,03E-04	-2,279105	CONSERVED HYPOTHETICAL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN YRBE1B
Rv0169	mce1A	9,14E-05	-2,407912	MCE-FAMILY PROTEIN MCE1A
Rv0231	fadE4	2,12E-04	-2,039193	Acyl-CoA dehydrogenase, putative
Rv0243	fadA2	1,92E-04	-2,112485	PROBABLE ACETYL-CoA ACYLTRANSFERASE FADA2 (3-KETOACYL-CoA THIOLASE) (BETA-KETOTHIOLASE)
Rv0244c	fadE5	8,72E-04	-2,523921	Acyl-CoA dehydrogenase
Rv0260c		0,002803	-2,844711	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL

				REGULATORY PROTEIN
Rv0280	ppe3	5,65E-05	-2,689237	Uncharacterized PPE family protein PPE3
Rv0312		1,71E-05	-4,410175	CONSERVED HYPOTHETICAL PROLINE AND THREONINE RICH PROTEIN
Rv0341	iniB	5,10E-04	-5,048808	ISONIAZID INDUCTIBLE GENE PROTEIN INIB
Rv0344c	lpqJ	1,08E-04	-2,940474	Lipoprotein, putative
Rv0430		2,96E-05	-3,011119	Putative uncharacterized protein
Rv0447c	ufaA1	5,93E-04	-2,89337	PROBABLE CYCLOPROPANE-FATTY-ACYL-PHOSPHOLIPID SYNTHASE UFAA1 (CYCLOPROPANE FATTY ACID SYNTHASE) (CFA SYNTHASE)
Rv0448c		0,002629	-4,498413	Putative uncharacterized protein
Rv0449c		0,00375	-5,759221	Putative uncharacterized protein
Rv0500.1		4,63E-05	-2,110103	Excisionase, putative
Rv0519c		0,00443	-2,102011	POSSIBLE CONSERVED MEMBRANE PROTEIN
Rv0573c		0,001338	-2,056807	Nicotinate phosphoribosyltransferase
Rv0575c		0,035606	-2,319624	Monooxygenase, putative
Rv0651	rplJ	0,003581	-2,021015	50S ribosomal protein L10
Rv0652	rplL	0,001545	-2,199319	50S ribosomal protein L7/L12
Rv0692		2,64E-06	-4,348449	Putative uncharacterized protein
Rv0693	pqqE	2,89E-06	-3,790021	MoaA/nifB/pqqE family protein
Rv0694	lldD1	5,65E-05	-2,414982	POSSIBLE L-LACTATE DEHYDROGENASE (CYTOCHROME) LLDD1
Rv0700	rpsJ	0,001016	-2,457715	30S ribosomal protein S10
Rv0823c	dus	0,019265	-2,160095	Probable tRNA-dihydrouridine synthase
Rv0824c	des	0,008399	-2,436853	PROBABLE ACYL-[ACYL-CARRIER PROTEIN]

				DESATURASE DESA1 (ACYL-[ACP] DESATURASE) (STEAROYL-ACP DESATURASE) (PROTEIN DES)
Rv0883c		0,010083	-2,340577	Uncharacterized protein Rv0883c/MT0906
Rv0885		6,85E-07	-10,43089	Uncharacterized protein Rv0885/MT0908
Rv0886	fprB	1,55E-05	-5,401993	Probable ferredoxin/ferredoxin--NADP reductase
Rv0887c		0,004235	-2,222287	Uncharacterized protein Rv0887c/MT0910
Rv0888		4,11E-05	-4,887959	Uncharacterized protein Rv0888/MT0911
Rv0891c		0,001429	-2,181813	Uncharacterized protein Rv0891c/MT0915
Rv0925c		7,22E-04	-2,222371	Putative uncharacterized protein
Rv0950c		8,11E-04	-2,284347	Peptidase, M23/M37 family
Rv0976c		1,24E-04	-2,297783	Putative uncharacterized protein
Rv0986		6,46E-05	-2,752221	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein Rv0986/MT1014
Rv0987		0,004756	-2,117119	PROBABLE ADHESION COMPONENT TRANSPORT TRANSMEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER
Rv0988		0,002912	-2,31401	Putative uncharacterized protein
Rv0997		0,001779	-2,908201	Putative uncharacterized protein
Rv1009	rpfB	1,21E-04	-2,326742	Probable resuscitation-promoting factor rpfB
Rv1013	pks16	2,45E-06	-3,559324	PUTATIVE POLYKETIDE SYNTHASE PKS16
Rv1015c	rplY	1,40E-04	-2,175672	50S ribosomal protein L25
Rv1041c		6,75E-05	-2,078933	POSSIBLE TRANSPOSASE
Rv1042c		1,69E-04	-2,330021	POSSIBLE TRANSPOSASE
Rv1046c		7,08E-04	-2,212237	Putative uncharacterized protein

Rv1076	lipU	3,15E-05	-4,36338	POSSIBLE LIPASE LIPU
Rv1094	desA2	0,010839	-2,161828	Acyl-(Acyl-carrier-protein) desaturase, putative
Rv1157c		0,006707	-2,765982	CONSERVED HYPOTHETICAL ALA-, PRO-RICH PROTEIN
Rv1158c		0,003608	-2,718722	CONSERVED HYPOTHETICAL ALA-, PRO-RICH PROTEIN
Rv1177	fdxC	1,73E-04	-2,111005	Ferredoxin
Rv1180	pks3	1,41E-05	-5,488053	PROBABLE POLYKETIDE BETA-KETOACYL SYNTHASE PKS3
Rv1181	pks4	3,30E-05	-5,045099	PROBABLE POLYKETIDE BETA-KETOACYL SYNTHASE PKS4
Rv1182	papA3	2,09E-05	-6,182908	PROBABLE CONSERVED POLYKETIDE SYNTHASE ASSOCIATED PROTEIN PAPA3
Rv1183	mmpL10	3,36E-05	-3,913189	Putative membrane protein mmpL10
Rv1184c		1,19E-06	-8,442472	POSSIBLE EXPORTED PROTEIN
Rv1185c	fadD21	2,01E-06	-4,173833	Putative fatty-acid--CoA ligase fadD21
Rv1195	PE13	1,89E-05	-30,00993	PE FAMILY PROTEIN
Rv1196	PPE18	1,92E-07	-8,390934	PPE FAMILY PROTEIN
Rv1219c		3,35E-04	-2,319065	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv1245c		0,005129	-2,119051	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv1251c		9,92E-04	-2,007863	Putative uncharacterized protein
Rv1252c	lprE	0,00172	-2,860811	Putative lipoprotein lprE
Rv1258c		2,90E-05	-3,029533	Uncharacterized protein Rv1258c/MT1297
Rv1270c	lprA	3,10E-04	-2,329241	Putative lipoprotein lprA
Rv1284		6,06E-04	-2,330525	Uncharacterized protein Rv1284/MT1322
Rv1297	rho	9,32E-04	-2,009976	Transcription termination factor rho

Rv1361c	PPE60//ppe19	9,46E-07	-9,607574	PE FAMILY PROTEIN//Uncharacterized PPE family protein PPE19
Rv1386	PE15	1,48E-05	-4,414726	Uncharacterized PE family protein PE15
Rv1387	ppe20	1,17E-04	-3,516696	Uncharacterized PPE family protein PPE20
Rv1405c		7,41E-04	-2,687905	Uncharacterized protein Rv1405c/MT1449
Rv1433		7,72E-04	-3,087354	POSSIBLE CONSERVED EXPORTED PROTEIN
Rv1434		6,83E-04	-2,187026	Putative uncharacterized protein
Rv1435c		2,14E-04	-3,235717	Probable conserved Proline, Glycine, Valine-rich secreted protein
Rv1477		1,14E-05	-2,567989	HYPOTHETICAL INVASION PROTEIN
Rv1478		3,17E-04	-2,020376	HYPOTHETICAL INVASION PROTEIN
Rv1491c		5,51E-05	-2,447125	TVP38/TMEM64 family membrane protein Rv1491c/MT1538
Rv1497	lipL	3,26E-04	-2,067514	PROBABLE ESTERASE LIPL
Rv1535		0,005518	-2,841251	Putative uncharacterized protein
Rv1566c		0,001432	-2,104902	Possible inv protein
Rv1592c		2,62E-05	-4,236643	Putative uncharacterized protein
Rv1622c	cydB	8,04E-05	-3,240541	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II
Rv1623c	cydA	1,53E-04	-3,343627	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I
Rv1638.1		6,02E-04	-2,17121	Putative uncharacterized protein
Rv1641	infC	2,14E-05	-3,379832	Translation initiation factor IF-3
Rv1642	rpmI	1,05E-04	-3,062447	50S ribosomal protein L35
Rv1643	rplT	2,38E-04	-2,722443	50S ribosomal protein L20
Rv1687c		1,02E-04	-2,247042	Antibiotic resistance ABC transporter, efflux system, ATP-binding protein
Rv1697		9,03E-04	-3,86356	Putative uncharacterized protein

Rv1698		0,001395	-3,490835	Channel-forming protein Rv1698/MT1737
Rv1699	pyrG	1,92E-05	-2,989922	CTP synthase
Rv1700		7,07E-05	-2,713233	MutT/nudix family protein
Rv1701	xerD	1,58E-04	-2,37128	Tyrosine recombinase xerD
Rv1734c		3,19E-05	-3,477049	Putative uncharacterized protein
Rv1754c		3,18E-04	-2,856906	Putative uncharacterized protein
Rv1780		3,85E-05	-2,266605	Putative uncharacterized protein
Rv1799	lppT	0,001353	-2,017857	PROBABLE LIPOPROTEIN LPPT
Rv1815		2,98E-06	-3,322994	Uncharacterized protein Rv1815/MT1863
Rv1856c		3,78E-05	-3,00401	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv1883c		6,42E-04	-2,069683	Putative uncharacterized protein
Rv1884c	rpfC	1,00E-06	-6,544043	PROBABLE RESUSCITATION- PROMOTING FACTOR RPFC
Rv1885c		1,14E-04	-2,165124	Chorismate mutase-related protein
Rv1886c	fbpB	7,17E-05	-2,334218	Antigen 85-B
Rv1904		8,08E-05	-2,605846	Anti-sigma factor antagonist
Rv1918c	PPE35	1,42E-04	-2,303175	PPE FAMILY PROTEIN
Rv1980c	mpt64	5,03E-04	-2,493803	Immunogenic protein MPT64
Rv1987		1,03E-05	-2,978969	Uncharacterized protein Rv1987/MT2041
Rv1988		1,33E-04	-2,790354	PROBABLE METHYLTRANSFERASE
Rv2033c		0,006072	-2,246472	Putative uncharacterized protein
Rv2058c	rpmB2	1,47E-04	-2,197045	50S ribosomal protein L28-2
Rv2069	sigC	3,77E-04	-2,772882	Probable RNA polymerase sigma-C factor
Rv2145c	ag84	3,76E-04	-2,101888	Antigen 84
Rv2147c	sepF	0,001657	-3,259614	Cell division protein sepF

Rv2150c	ftsZ	0,003877	-2,377654	Cell division protein ftsZ
Rv2154c		1,70E-04	-2,4986	Uncharacterized ftsW-like protein Rv2154c/MT2213
Rv2163c	pbpB	0,010539	-2,033452	Probable penicillin-binding membrane protein pbpB
Rv2165c	mraW	2,00E-04	-2,255791	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase mraW
Rv2166c	mraZ	1,42E-04	-2,600549	Protein mraZ
Rv2187	fadD15	0,001953	-2,267746	Probable long-chain-fatty-acid-CoA ligase fadD15 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv2190c		3,24E-04	-3,166779	Uncharacterized protein Rv2190c/MT2245
Rv2203		0,003627	-2,031064	Uncharacterized protein Rv2203/MT2259
Rv2220	glnA1	1,69E-04	-2,081058	Glutamine synthetase 1
Rv2243	fabD	1,32E-05	-3,227139	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase
Rv2244	acpM	1,28E-07	-7,724329	Meromycolate extension acyl carrier protein
Rv2245	kasA	6,63E-06	-6,258103	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 1
Rv2246	kasB	2,16E-05	-5,134563	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2
Rv2247	accD6	6,47E-05	-3,615325	Probable propionyl-CoA carboxylase beta chain 6
Rv2248		1,96E-04	-2,305208	Uncharacterized protein Rv2248/MT2308
Rv2255c		5,92E-04	-2,347572	Putative uncharacterized protein
Rv2267c		2,04E-04	-2,920705	Uncharacterized protein Rv2267c/MT2329
Rv2268c	cyp128	3,63E-04	-3,191071	Putative cytochrome P450 128
Rv2276	cyp121	8,57E-05	-2,183112	Cytochrome P450 121
Rv2329c	narK1	2,05E-05	-4,013556	Nitrite extrusion protein
Rv2331		1,23E-04	-3,258233	Uncharacterized protein Rv2331/MT2393
Rv2336		1,37E-05	-3,452246	Putative uncharacterized protein
Rv2338c	moeW	0,003751	-2,140433	HesA/MoeB/ThiF family protein

Rv2348c		0,001387	-2,376154	Putative uncharacterized protein
Rv2349c	plcC	0,003346	-2,105458	Phospholipase C 3
Rv2350c	plcB	0,001105	-2,63041	Phospholipase C 2
Rv2351c	plcA	4,27E-05	-4,051869	Phospholipase C 1
Rv2356c	ppe40	3,01E-04	-3,065817	Uncharacterized PPE family protein PPE40
Rv2416c	eis	0,002425	-2,322391	Enhanced intracellular survival protein
Rv2430c	PPE41	0,010072	-2,572401	PPE FAMILY PROTEIN
Rv2431c	PE25	0,001638	-2,952362	PE FAMILY PROTEIN
Rv2485c	lipQ	0,018577	-2,381748	Carboxylesterase family protein
Rv2499c		7,41E-04	-2,158995	MoaC family protein
Rv2500c	fadE19	0,003864	-2,001466	Acyl-CoA dehydrogenase
Rv2501c	accA1	0,002969	-2,375547	Acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase alpha chain
Rv2502c	accD1	0,001483	-2,368284	PROBABLE ACETYL-/PROPIONYL-CoA CARBOXYLASE (BETA SUBUNIT) ACCD1
Rv2503c	scoB	8,96E-04	-3,463035	Probable succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B
Rv2505c	fadD35	7,13E-05	-2,137961	PROBABLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD35 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv2513		1,90E-04	-2,774337	Putative uncharacterized protein
Rv2518c	lppS	1,05E-04	-2,071267	PROBABLE CONSERVED LIPOPROTEIN LPPS
Rv2560		6,28E-04	-2,67511	Uncharacterized protein Rv2560/MT2637
Rv2593c	ruvA	6,38E-04	-2,37849	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase ruvA
Rv2594c	ruvC	1,31E-05	-3,267304	Crossover junction endodeoxyribonuclease ruvC
Rv2629		0,01574	-2,0053	Putative uncharacterized protein
Rv2663		1,90E-04	-2,331487	Putative uncharacterized protein

Rv2719c		0,004895	2,274494	POSSIBLE CONSERVED MEMBRANE PROTEIN
Rv2721c		2,02E-04	-2,720969	POSSIBLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE AND GLYCINE RICH PROTEIN
Rv2736c	recX	0,010098	-2,074661	Regulatory protein recX
Rv2737c	recA	0,001151	-2,93211	Protein recA
Rv2846c	efpA	0,003882	-2,556066	Efflux protein
Rv2864c		0,002225	-3,27133	POSSIBLE PENICILLIN- BINDING LIPOPROTEIN
Rv2873	mpt83	0,00321	-7,505724	Cell surface lipoprotein MPT83
Rv2874	dipZ	0,0085	-2,611359	Protein dipZ
Rv2875	mpt70	0,003773	-13,66442	Immunogenic protein MPT70
Rv2894c	xerC	0,00277	-2,736707	Tyrosine recombinase xerC
Rv2927c		0,005297	-2,957529	Uncharacterized protein Rv2927c/MT2997
Rv2940c	mas	8,17E-04	-2,249973	Mycocerosic acid synthase
Rv2949c		0,002306	-2,074499	Chorismate--pyruvate lyase
Rv2950c	fadD29	0,006068	-2,131352	PROBABLE FATTY-ACID- CoA LIGASE FADD29 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY- ACID-CoA SYNTHASE)
Rv2986c	hup	0,00658	-2,699668	DNA-binding protein HU homolog
Rv2990c		2,06E-05	-2,367436	Putative uncharacterized protein
Rv3005c		2,30E-04	-2,829114	Putative uncharacterized protein
Rv3049c		4,05E-06	-3,471563	Monoxygenase, flavin- binding family
Rv3065	mmr	0,007907	-2,080595	Multidrug resistance protein mmr
Rv3086	adhD	0,017213	-2,083183	PROBABLE ZINC-TYPE ALCOHOL DEHYDROGENASE ADHD (ALDEHYDE REDUCTASE)
Rv3126c		6,05E-05	-3,072044	Putative uncharacterized protein
Rv3127		0,001218	-2,742208	Putative uncharacterized protein

Rv3128c		0,0163	-2,110387	
Rv3130c		0,003925	-2,666078	UPF0089 protein Rv3130c/MT3216
Rv3133c	devR	0,002511	-2,185852	DNA-binding response regulator, LuxR family
Rv3134c		0,002912	-2,327783	Putative uncharacterized protein
Rv3135	ppe50	2,45E-04	-3,354885	Uncharacterized PPE family protein PPE50
Rv3136	ppe51	1,90E-04	-3,425517	Uncharacterized PPE family protein PPE51
Rv3139	fadE24	6,75E-06	-3,378491	PROBABLE ACYL-CoA DEHYDROGENASE FADE24
Rv3140	fadE23	1,92E-05	-2,799449	Acyl-CoA dehydrogenase
Rv3197A	whiB7	6,24E-04	-3,775834	PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN WHIB-LIKE WHIB7
Rv3209		3,18E-04	-2,626619	CONSERVED HYPOTHETICAL THREONIN AND PROLINE RICH PROTEIN
Rv3258c		7,24E-04	-2,166471	Putative uncharacterized protein
Rv3289c		0,002767	-2,17074	POSSIBLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv3290c	lat	0,002993	-2,503373	Probable L-lysine-epsilon aminotransferase
Rv3310		2,08E-05	-3,711078	Acid phosphatase, putative
Rv3312A	mtp	1,75E-04	-2,349897	Pilin
Rv3330	dacB1	2,29E-04	-2,814445	PROBABLE PENICILLIN- BINDING PROTEIN DACB1 (D-ALANYL-D-ALANINE CARBOXYPEPTIDASE) (DD-PEPTIDASE) (DD- CARBOXYPEPTIDASE) (PBP) (DD- TRANSPEPTIDASE) (SERINE-TYPE D-ALA-D- ALA CARBOXYPEPTIDASE) (D- AMINO ACID HYDROLASE)

Rv3338		0,001322	-2,062867	Putative uncharacterized protein
Rv3354		1,81E-04	-2,364451	Putative uncharacterized protein
Rv3371		1,59E-04	-2,14966	UPF0089 protein Rv3371/MT3481
Rv3390	lpqD	3,75E-06	-3,152872	PROBABLE CONSERVED LIPOPROTEIN LPQD
Rv3413c		1,63E-04	-2,72821	Uncharacterized protein Rv3413c/MT3522
Rv3414c	sigD	3,64E-05	-2,975686	Probable RNA polymerase sigma-D factor
Rv3477	PE31	1,64E-06	-15,67489	PE FAMILY PROTEIN
Rv3478	PPE60	6,78E-04	-6,964097	PE FAMILY PROTEIN
Rv3479		7,36E-05	-2,745016	POSSIBLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv3487c	lipF	1,03E-06	-5,128196	PROBABLE ESTERASE/LIPASE LIPF
Rv3582c	ispD	5,98E-04	-2,042142	2-C-methyl-D-erythritol 4- phosphate cytidyltransferase
Rv3613c		5,99E-05	-4,483018	Putative uncharacterized protein
Rv3614c		5,93E-05	-4,992536	Putative uncharacterized protein
Rv3615c		2,58E-04	-5,464762	Uncharacterized protein Rv3615c/MT3717
Rv3616c		1,60E-04	-6,356792	CONSERVED HYPOTHETICAL ALANINE AND GLYCINE RICH PROTEIN
Rv3623	lpqG	0,002944	-2,038857	Lipoprotein, putative
Rv3686c		1,58E-04	-2,680021	Putative uncharacterized protein
Rv3711c	dnaQ	0,045004	-2,076596	PROBABLE DNA POLYMERASE III (EPSILON SUBUNIT) DNAQ
Rv3717		8,22E-05	-2,77084	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase-related protein
Rv3746c	PE34	3,47E-05	-2,521118	PROBABLE PE FAMILY PROTEIN (PE FAMILY- RELATED PROTEIN)
Rv3760		0,035971	-2,617153	POSSIBLE CONSERVED MEMBRANE PROTEIN
Rv3763	lpqH	7,31E-04	-3,386579	Lipoprotein lpqH

Rv3788		9,94E-05	-2,016598	Uncharacterized protein Rv3788/MT3896
Rv3810	erp	7,38E-04	-2,101378	Exported repetitive protein
Rv3811		1,17E-04	-2,463836	Putative uncharacterized protein
Rv3823c	mmpL8	3,30E-05	-2,4168	Membrane transport protein mmpL8
Rv3824c	papA1	6,10E-05	-3,687223	SL659 acyltransferase papA1
Rv3825c	pks2	0,001702	-2,169493	Phthioceranic/hydroxyphthioce ranic acid synthase
Rv3826	fadD23	1,24E-04	-2,034154	Acyl-CoA synthase
Rv3849		5,99E-06	-3,424799	Putative uncharacterized protein
Rv3854c	ethA	0,002545	-2,180779	MONOOXYGENASE ETHA

## APÊNDICE D – Listas dos genes diferencialmente expressos após tratamento com podoandina

Lista dos genes diferencialmente expressos após tratamento com podoandina (lactona sesquiterpênica que não apresenta atividade antimicobacteriana), que apresentaram alteração maior que 2 vezes e  $p < 0,05$ . Tratamento realizado em concentração 100 µg/mL, por 4 horas. Sinais negativos indicam redução na expressão gênica.

ID	Nome gene	p	Alteração (x)	Descrição
Rv0251c	hsp	0,009943	2,168637	HEAT SHOCK PROTEIN HSP (HEAT-STRESS-INDUCED RIBOSOME-BINDING PROTEIN A)
Rv0452		5,02E-04	3,220659	POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv0560c		0,001298	2,601683	POSSIBLE BENZOQUINONE METHYLTRANSFERASE (METHYLASE)
Rv0676c	mmpL5	9,91E-06	4,754901	Putative membrane protein mmpL5
Rv0677c	mmpS5	0,002808	3,150038	Putative membrane protein mmpS5
Rv0678		0,023471	4,384006	Putative uncharacterized protein
Rv0693	pqqE	0,011804	2,055078	MoaA/nifB/pqqE family protein
Rv0694	lldD1	0,006758	2,17395	POSSIBLE L-LACTATE DEHYDROGENASE (CYTOCHROME) LLDD1
Rv1217c		0,0088	2,299006	PROBABLE TETRONASIN-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER
Rv1557	mmpL6	2,08E-06	8,571634	Putative membrane protein mmpL6
Rv2011c		0,002808	2,121011	Uncharacterized protein Rv2011c/MT2066
Rv2015c		0,011804	2,013724	Putative uncharacterized protein
Rv2885c		0,022721	2,182314	Uncharacterized protein Rv2885c/MT2953

Rv2977c	thiL	0,024778	2,249875	PROBABLE THIAMINE-MONOPHOSPHATE KINASE THIL (THIAMINE-PHOSPHATE KINASE)
Rv2978c		0,009943	2,102589	IS1538, transposase
Rv3054c		3,18E-04	3,017192	Putative uncharacterized protein
Rv3161c		0,017136	2,117371	POSSIBLE DIOXYGENASE
Rv3201c		0,006758	2,168106	Helicase, UvrD/Rep family
Rv1040c	PE8	0,020798	-2,257634	PE FAMILY PROTEIN

## APÊNDICE E – Listas dos genes em comum, diferencialmente expressos após tratamento com LS01, LS06 e LS07

Lista dos genes em comum diferencialmente expressos após tratamento com LS01, LS06 e LS07, que apresentaram alteração maior que 2 vezes e  $p < 0,05$ . Tratamento realizado em concentrações correspondentes a 10xMIC, por 4 horas.

Gene superexpressos		
ID	Nome gene	Descrição
Rv3223c	rpoE	RNA polymerase sigma-E factor
Rv0816c	thiX	PROBABLE THIOREDOXIN THIX
Rv0351	grpE	Protein grpE
Rv3206c	moeB1	HesA/MoeB/ThiF family protein
Rv0794c		PROBABLE OXIDOREDUCTASE
Rv0687		Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv3082c	virS	Putative virulence-regulating 38 kDa protein
Rv1767		Putative uncharacterized protein
Rv2699c		Putative uncharacterized protein
Rv1586c		Probable phiRv1 integrase//Partial REP13E12 repeat protein
Rv2745c		DNA-binding protein, putative
Rv3176c	mesT	PROBABLE EPOXIDE HYDROLASE MEST (EPOXIDE HYDRATASE) (ARENE-OXIDE HYDRATASE)
Rv1992c	ctpG	Probable cation-transporting ATPase G
Rv1039c	ppe15	Uncharacterized PPE family protein PPE15
Rv0814c	sseC1	Putative uncharacterized protein
Rv1131	gltA1	Citrate synthase
Rv2640c		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv3205c		Putative uncharacterized protein
Rv2204c		Protein Rv2204c/MT2260

Rv2466c		Putative uncharacterized protein
Rv2397c	cysA	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein cysA
Rv2398c	cysW	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYSW
Rv1528c	papA4	PROBABLE CONSERVED POLYKETIDE SYNTHASE ASSOCIATED PROTEIN PAPA4
Rv2400c	subI	PROBABLE SULFATE-BINDING LIPOPROTEIN SUBI
Rv3270	ctpC	Probable cation-transporting P-type ATPase C
Rv2465c	rpiB	Ribose-5-phosphate isomerase B
Rv3177		POSSIBLE PEROXIDASE (NON-HAEM PEROXIDASE)
Rv0353	hspR	PROBABLE HEAT SHOCK PROTEIN TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR HSPR (MERR FAMILY)
Rv0325		Putative uncharacterized protein
Rv1874		Putative uncharacterized protein
Rv1335	cfp10A	9.5 kDa culture filtrate antigen cfp10A
Rv0142		Putative uncharacterized protein
Rv3334		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY MERR-FAMILY)
Rv1472	echA12	Probable enoyl-CoA hydratase echA12
Rv0791c		Putative uncharacterized protein
Rv3464	rmlB	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
Rv1334		Uncharacterized protein Rv1334/MT1376
Rv3463		Putative uncharacterized protein
Rv3174		Oxidoreductase
Rv0990c		Putative uncharacterized protein
Rv1994c	cmtR	HTH-type transcriptional regulator cmtR
Rv0331		POSSIBLE DEHYDROGENASE/REDUCTASE
Rv1336	cysM	Cysteine synthase B
Rv1129c		DNA-binding protein, putative
Rv2602		Putative uncharacterized protein
Rv0792c		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY

		GNTR-FAMILY)
Rv3765c		PROBABLE TWO COMPONENT TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3221.1		POSSIBLE ANTI-SIGMA FACTOR
Rv0324		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (POSSIBLY ARSR- FAMILY)
Rv1674c		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3222c		Putative uncharacterized protein
Rv3833		TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARAC-FAMILY)
Rv2641	cadI	Cadmium-induced protein cadI
Rv1875		Putative uncharacterized protein
Rv3173c		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY TETR/ACRR-FAMILY)
Rv0847	lpqS	PROBABLE LIPOPROTEIN LPQS
Rv1801	ppe29	Uncharacterized PPE family protein PPE29
Rv1673c		Putative uncharacterized protein
Rv0140		Putative uncharacterized protein
Rv2601.1		Putative uncharacterized protein
Rv1471	trx-2	PROBABLE THIOREDOXIN TRXB1
Rv3119	moaE1	Molybdopterin-converting factor subunit 2 1
Rv3914	trxA	Thioredoxin
Rv1909c	fur	Ferric uptake regulation protein
Rv0793		Putative uncharacterized protein
Rv0352	dnaJ1	Chaperone protein dnaJ 1
Rv1585c		Possible phage phiRv1 protein
Rv0384c	clpB	Chaperone protein clpB
Rv0327c	CYP135A1	Putative cytochrome P450 135A1
Rv2642		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv2399c	cysT	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYST

Rv1395		Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv1395/MT1440
Rv2707		PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv1221	sigE	ALTERNATIVE RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR SIGE
Rv3913	trxB	Thioredoxin reductase
Rv3017c	esxQ	ESAT-6-like protein esxQ
Rv3175		POSSIBLE AMIDASE (AMINOHYDROLASE)
Rv1993c		Uncharacterized protein Rv1993c/MT2049
Rv2643	arsC	Arsenical resistance protein/arsenate reductase
Rv1130		MmgE/PrpD family protein
<b>Genes supraexpressos</b>		
<b>Identificação</b>	<b>Nome gene</b>	<b>Descrição</b>
Rv0141c		Putative uncharacterized protein
Rv0260c		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3763	lpqH	Lipoprotein lpqH
Rv1361c	PPE60///ppe19	PE FAMILY PROTEIN///Uncharacterized PPE family protein PPE19
Rv1196	PPE18	PPE FAMILY PROTEIN
Rv3614c		Putative uncharacterized protein
Rv1884c	rpfC	PROBABLE RESUSCITATION-PROMOTING FACTOR RPFC
Rv3354		Putative uncharacterized protein
Rv2990c		Putative uncharacterized protein
Rv1386	PE15	Uncharacterized PE family protein PE15
Rv0280	ppe3	Uncharacterized PPE family protein PPE3
Rv3477	PE31	PE FAMILY PROTEIN
Rv1592c		Putative uncharacterized protein
Rv2058c	rpmB2	50S ribosomal protein L28-2
Rv3613c		Putative uncharacterized protein
Rv0888		Uncharacterized protein Rv0888/MT0911

## APÊNDICE F – Listas dos genes em comum, diferencialmente expressos após tratamento com LS06 e LS07

Lista dos genes em comum diferencialmente expressos após tratamento com LS06 e LS07, que apresentaram alteração maior que 2 vezes e  $p < 0,05$ . Tratamento realizado em concentrações correspondentes a 10xMIC, por 4 horas.

<b>Genes superexpressos</b>		
<b>ID</b>	<b>Nome gene</b>	<b>Descrição</b>
Rv2963		PROBABLE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN
Rv3061c	fadE22	Acyl-CoA dehydrogenase, putative
Rv0711	atsA	POSSIBLE ARYLSULFATASE ATSA (ARYL-SULFATE SULPHOHYDROLASE) (ARYLSULPHATASE)
Rv2667		Uncharacterized protein Rv2667/MT2741
Rv2053c		PROBABLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv0789c		Putative uncharacterized protein
Rv1658	argG	Argininosuccinate synthase
Rv2454c		PROBABLE OXIDOREDUCTASE (BETA SUBUNIT)
Rv0328		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (POSSIBLY TETR/ACRR-FAMILY)
Rv1265		Uncharacterized protein Rv1265/MT1303
Rv0850		IS1606', transposase
Rv1656	argF	Ornithine carbamoyltransferase
Rv0190		Putative uncharacterized protein
Rv1652	argC	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
Rv0846c		Copper-binding protein, putative
Rv2372c	rsmE	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E
Rv1342c		Uncharacterized protein Rv1342c/MT1383
Rv1908c	katG	Catalase-peroxidase
Rv0790c		Putative uncharacterized protein

Rv0350	dnaK	Chaperone protein dnaK
Rv1654	argB	Acetylglutamate kinase
Rv0303		Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv1657	argR	Arginine repressor
Rv3596c	clpC	Probable ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
Rv3837c		PROBABLE PHOSPHOGLYCERATE MUTASE (PHOSPHOGLYCEROMUTASE) (PHOSPHOGLYCERATE PHOSPHOMUTASE)
Rv2710	mysB	RNA polymerase sigma factor
Rv2694c		Putative uncharacterized protein
Rv3060c		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY GNTR-FAMILY)
Rv1655	argD	Acetylornithine aminotransferase
Rv1132		CONSERVED MEMBRANE PROTEIN
Rv2453c	mobA	Probable molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A
Rv0563	htpX	Probable protease htpX homolog
Rv2050		Putative uncharacterized protein
Rv2743c		POSSIBLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE RICH PROTEIN
Rv0436c	pssA	CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase
Rv0250c		Putative uncharacterized protein
Rv1653	argJ	Arginine biosynthesis bifunctional protein argJ
Rv1659	argH	Argininosuccinate lyase
Rv0848	cysK2	POSSIBLE CYSTEINE SYNTHASE A CYSK2 (O-ACETYL SERINE SULFHYDRYLASE) (O-ACETYL SERINE (THIOL)-LYASE) (CSASE)
Rv0826		Putative uncharacterized protein
Rv3120		Putative uncharacterized protein
Rv3048c	nrdF2	RIBONUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE REDUCTASE (BETA CHAIN) NRDF2 (RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE SMALL SUBUNIT) (R2F PROTEIN)
Rv0849		PROBABLE CONSERVED INTEGRAL MEMBRANE TRANSPORT PROTEIN

Rv2052c		Putative uncharacterized protein
Rv2693c		PROBABLE CONSERVED INTEGRAL MEMBRANE ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv2744c		35 kDa protein
Rv1766		Putative uncharacterized protein
Rv3223c	rpoE	RNA polymerase sigma-E factor
Rv0816c	thiX	PROBABLE THIOREDOXIN THIX
Rv0351	grpE	Protein grpE
Rv3206c	moeB1	HesA/MoeB/ThiF family protein
Rv0794c		PROBABLE OXIDOREDUCTASE
Rv0687		Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
Rv3082c	virS	Putative virulence-regulating 38 kDa protein
Rv1767		Putative uncharacterized protein
Rv2699c		Putative uncharacterized protein
Rv1586c		Probable phiRv1 integrase///Partial REP13E12 repeat protein
Rv2745c		DNA-binding protein, putative
Rv3176c	mesT	PROBABLE EPOXIDE HYDROLASE MEST (EPOXIDE HYDRATASE) (ARENE-OXIDE HYDRATASE)
Rv1992c	ctpG	Probable cation-transporting ATPase G
Rv1039c	ppe15	Uncharacterized PPE family protein PPE15
Rv0814c	sseC1	Putative uncharacterized protein
Rv1131	gltA1	Citrate synthase
Rv2640c		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv3205c		Putative uncharacterized protein
Rv2204c		Protein Rv2204c/MT2260
Rv2466c		Putative uncharacterized protein
Rv2397c	cysA	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein cysA
Rv2398c	cysW	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYSW

Rv1528c	papA4	PROBABLE CONSERVED POLYKETIDE SYNTHASE ASSOCIATED PROTEIN PAPA4
Rv2400c	subI	PROBABLE SULFATE-BINDING LIPOPROTEIN SUBI
Rv3270	ctpC	Probable cation-transporting P-type ATPase C
Rv2465c	rpiB	Ribose-5-phosphate isomerase B
Rv3177		POSSIBLE PEROXIDASE (NON-HAEM PEROXIDASE)
Rv0353	hspR	PROBABLE HEAT SHOCK PROTEIN TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR HSPR (MERR FAMILY)
Rv0325		Putative uncharacterized protein
Rv1874		Putative uncharacterized protein
Rv1335	cfp10A	9.5 kDa culture filtrate antigen cfp10A
Rv0142		Putative uncharacterized protein
Rv3334		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY MERR-FAMILY)
Rv1472	echA12	Probable enoyl-CoA hydratase echA12
Rv0791c		Putative uncharacterized protein
Rv3464	rmlB	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
Rv1334		Uncharacterized protein Rv1334/MT1376
Rv3463		Putative uncharacterized protein
Rv3174		Oxidoreductase
Rv0990c		Putative uncharacterized protein
Rv1994c	cmtR	HTH-type transcriptional regulator cmtR
Rv0331		POSSIBLE DEHYDROGENASE/REDUCTASE
Rv1336	cysM	Cysteine synthase B
Rv1129c		DNA-binding protein, putative
Rv2602		Putative uncharacterized protein
Rv0792c		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY GNTR-FAMILY)
Rv3765c		PROBABLE TWO COMPONENT TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3221.1		POSSIBLE ANTI-SIGMA FACTOR
Rv0324		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (POSSIBLY ARSR-

		FAMILY)
Rv1674c		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3222c		Putative uncharacterized protein
Rv3833		TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARAC-FAMILY)
Rv2641	cadI	Cadmium-induced protein cadI
Rv1875		Putative uncharacterized protein
Rv3173c		PROBABLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY TETR/ACRR-FAMILY)
Rv0847	lpqS	PROBABLE LIPOPROTEIN LPQS
Rv1801	ppe29	Uncharacterized PPE family protein PPE29
Rv1673c		Putative uncharacterized protein
Rv0140		Putative uncharacterized protein
Rv2601.1		Putative uncharacterized protein
Rv1471	trx-2	PROBABLE THIOREDOXIN TRXB1
Rv3119	moaE1	Molybdopterin-converting factor subunit 2 1
Rv3914	trxA	Thioredoxin
Rv1909c	fur	Ferric uptake regulation protein
Rv0793		Putative uncharacterized protein
Rv0352	dnaJ1	Chaperone protein dnaJ 1
Rv1585c		Possible phage phiRv1 protein
Rv0384c	clpB	Chaperone protein clpB
Rv0327c	CYP135A1	Putative cytochrome P450 135A1
Rv2642		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN (PROBABLY ARSR-FAMILY)
Rv2399c	cysT	PROBABLE SULFATE-TRANSPORT INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN ABC TRANSPORTER CYST
Rv1395		Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Rv1395/MT1440
Rv2707		PROBABLE CONSERVED TRANSMEMBRANE ALANINE AND LEUCINE RICH PROTEIN
Rv1221	sigE	ALTERNATIVE RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR SIGE
Rv3913	trxB	Thioredoxin reductase

Rv3017c	esxQ	ESAT-6-like protein esxQ
Rv3175		POSSIBLE AMIDASE (AMINOHYDROLASE)
Rv1993c		Uncharacterized protein Rv1993c/MT2049
Rv2643	arsC	Arsenical resistance protein/arsenate reductase
Rv1130		MmgE/PrpD family protein
<b>Genes supraexpressos</b>		
<b>Identificação</b>	<b>Nome gene</b>	<b>Descrição</b>
Rv3290c	lat	Probable L-lysine-epsilon aminotransferase
Rv3135	ppe50	Uncharacterized PPE family protein PPE50
Rv0448c		Putative uncharacterized protein
Rv2276	cyp121	Cytochrome P450 121
Rv1387	ppe20	Uncharacterized PPE family protein PPE20
Rv2874	dipZ	Protein dipZ
Rv1535		Putative uncharacterized protein
Rv2069	sigC	Probable RNA polymerase sigma-C factor
Rv3479		POSSIBLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv1815		Uncharacterized protein Rv1815/MT1863
Rv1623c	cydA	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I
Rv2503c	scoB	Probable succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B
Rv0312		CONSERVED HYPOTHETICAL PROLINE AND THREONINE RICH PROTEIN
Rv0059		Putative uncharacterized protein
Rv0058	dnaB	Replicative DNA helicase
Rv0098		Uncharacterized protein Rv0098/MT0107
Rv0167	yrbE1A	CONSERVED HYPOTHETICAL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN YRBE1A
Rv3615c		Uncharacterized protein Rv3615c/MT3717
Rv0100		Uncharacterized protein Rv0100/MT0109
Rv0166	fadD5	PROBABLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD5 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv2950c	fadD29	PROBABLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD29 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)

Rv0169	mce1A	MCE-FAMILY PROTEIN MCE1A
Rv1622c	cydB	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II
Rv2190c		Uncharacterized protein Rv2190c/MT2245
Rv0887c		Uncharacterized protein Rv0887c/MT0910
Rv1918c	PPE35	PPE FAMILY PROTEIN
Rv1734c		Putative uncharacterized protein
Rv2940c	mas	Mycocerosic acid synthase
Rv1754c		Putative uncharacterized protein
Rv0096	ppe1	Uncharacterized PPE family protein PPE1
Rv0033	acpA	Acyl carrier protein
Rv0099	fadD10	POSSIBLE FATTY-ACID-CoA LIGASE FADD10 (FATTY-ACID-CoA SYNTHETASE) (FATTY-ACID-CoA SYNTHASE)
Rv0449c		Putative uncharacterized protein
Rv3487c	lipF	PROBABLE ESTERASE/LIPASE LIPF
Rv2949c		Chorismate--pyruvate lyase
Rv0447c	ufaA1	PROBABLE CYCLOPROPANE-FATTY-ACYL- PHOSPHOLIPID SYNTHASE UFAA1 (CYCLOPROPANE FATTY ACID SYNTHASE) (CFA SYNTHASE)
Rv3289c		POSSIBLE TRANSMEMBRANE PROTEIN
Rv0032	bioF2	Aminotransferase, class II
Rv0168	yrbE1B	CONSERVED HYPOTHETICAL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN YRBE1B
Rv3136	ppe51	Uncharacterized PPE family protein PPE51
Rv3478	PPE60	PE FAMILY PROTEIN
Rv0141c		Putative uncharacterized protein
Rv0260c		POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
Rv3763	lpqH	Lipoprotein lpqH
Rv1361c	PPE60///ppe19	PE FAMILY PROTEIN///Uncharacterized PPE family protein PPE19
Rv1196	PPE18	PPE FAMILY PROTEIN
Rv3614c		Putative uncharacterized protein
Rv1884c	rpfC	PROBABLE RESUSCITATION-PROMOTING FACTOR RPF C

Rv3354		Putative uncharacterized protein
Rv2990c		Putative uncharacterized protein
Rv1386	PE15	Uncharacterized PE family protein PE15
Rv0280	ppe3	Uncharacterized PPE family protein PPE3
Rv3477	PE31	PE FAMILY PROTEIN
Rv1592c		Putative uncharacterized protein
Rv2058c	rpmB2	50S ribosomal protein L28-2
Rv3613c		Putative uncharacterized protein
Rv0888		Uncharacterized protein Rv0888/MT0911