

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ADRIANA FRANÇOZO DE MELO

REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE:
UMA ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO*

BRASÍLIA

2022

Adriana Françoze de Melo

REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE:
UMA ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello

BRASÍLIA

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me permitir realizar este trabalho e a chegar até aqui.

À minha família, meu pai, minha mãe e minha irmã, que sempre estiveram ao meu lado e nunca mediram esforços para me auxiliar em qualquer situação na vida.

Ao meu orientador, professor Maurício, por acreditar na minha capacidade de realizar este trabalho e também pela amizade e conversas ao longo da minha vida acadêmica.

À professora Pérola, que desde a época da graduação esteve presente em minha vida e também me incentivou a entrar para o mestrado.

À Doutora Glaura, por permitir que esta pesquisa fosse realizada no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-DF) e por toda a ajuda concedida.

À Giulia, minha colega de pesquisa, que me acompanhou por toda essa trajetória e me auxiliou durante os momentos de laboratório.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram a realizar o mestrado e manter firme nessa jornada.

Aos meus colegas de trabalho do Grupo Oncoclínicas que em qualquer momento que fosse necessário me liberavam para eu realizar a parte prática da pesquisa e me incentivavam a me manter firme.

RESUMO

MELO, Adriana Françoze de. **REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE: UMA ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO***. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2022.

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e acomete 10 milhões de pessoas por ano, levando mais de 1 milhão a óbito no mesmo período. Os medicamentos utilizados para o tratamento de primeira linha da tuberculose são a Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol, que podem perder sua eficácia devido à resistência associada a diversas mutações que a bactéria pode apresentar. Considerando a dificuldade de lançamento de medicamentos inovadores, uma alternativa é o reposicionamento de fármacos que se encontram no mercado e que ainda não foram testados para essa patologia específica. Uma forma que diminui custos e tempo investidos para a escolha de um fármaco é a metodologia *in silico*, que consiste em realizar testes computacionais por meio de softwares para predizer se existe interação entre a molécula de interesse e o alvo molecular. No presente estudo, realizou-se a busca de potenciais ligantes a alvos moleculares dos fármacos de primeira linha rifampicina (RNA-polimerase) e da isoniazida (enoil-ACP- redutase). O ligante obtido com melhor resultado (para ambos os alvos) *in silico* foi a Coenzima Q₁₀, que foi então avaliado *in vitro* para a determinação de sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) com a finalidade de verificar o efeito dessa molécula diretamente na bactéria da tuberculose. O resultado obtido não demonstrou alta atividade dentro da faixa de concentração testada, o que denota a importância dos testes biológicos mesmo com resultados computacionais relevantes. Outros ligantes devem ainda ser testados para confirmar se a abordagem computacional obteve algum grau de eficácia.

Palavras-chave: tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; reposicionamento de fármacos; *in silico*; *in vitro*.

ABSTRACT

MELO, Adriana Françoço de. **DRUG REPURPOSING FOR TUBERCULOSIS TREATMENT: NA *IN SILICO* AND *IN VITRO* ANALYSIS.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2022.

Tuberculosis is an infectious disease caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis* and affects 10 million people a year, leading to more than 1 million deaths in the same period. The drugs used for the first-line treatment of tuberculosis are Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamide, and Ethambutol, which can lose their effectiveness due to resistance associated with the various mutations that the bacteria can present. Considering the difficulty in launching innovative drugs, one alternative is the repositioning of drugs that are on the market and have not yet been tested for this specific pathology. One way to reduce costs and time invested in the choice of a drug is the *in silico* methodology, which consists in performing computational tests to predict whether there is interaction between the molecule of interest and the molecular target. In the present study, the search for potential ligands to molecular targets of the first-line rifampicin (RNA-polymerase) and isoniazid (enoyl-ACP-reductase) drugs was performed. The ligand obtained with the best result (for both targets) *in silico* was Coenzyme Q₁₀, which was then evaluated *in vitro* to determine its Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in order to verify the effect of this molecule directly on tuberculosis bacteria. The result obtained did not show high activity within the concentration range tested, which denotes the importance of biological tests even with relevant computational results. Other ligands should still be tested to confirm if the computational approach achieved any degree of effectiveness.

Key words: tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; drug repurposing; *in silico*; *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 - Estrutura molecular da rifampicina.....	15
Figura 2 - Conversão da isoniazida em sua forma ativa.....	16
Figura 3 - Filtros utilizados para a confecção da base de ligantes.....	20
Figura 4 – Placa de 96 poços com colunas de 1 a 12 e fileiras de A a H.....	22
Figura 5 – Resazurina sendo reduzida a resorufina e posteriormente a dihidroresorufina.....	23
Figura 6 - Equação da porcentagem de redução da resazurina.....	23
Figura 7 - Equação da porcentagem de redução da resazurina.....	23
Figura 8 - Como é realizada uma diluição seriada.....	25
Figura 9 - Coenzima Q ₁₀ docada na RNA polimerase.....	27
Figura 10 - Coenzima Q ₁₀ docada na Enoil-ACP-Redutase.....	27
Figura 11 – Moléculas validadas.....	29
Figura 12 - Estrutura molecular da Coenzima Q ₁₀	29
Figura 13 - Uma seção da membrana interna mitocondrial com o sistema de transporte de elétrons e ATP sintase.....	30
Figura 14 – Ilustração de uma partícula de nanoemulsão.....	32
Figura 15 - Placa de 96 poços com DMF e água com a resazurina recém aplicada.....	33
Figura 16 - Placa de 96 poços com rifampicina, isoniazida, controle do DMF e controle negativo.....	35
Figura 17 - Placa de 96 poços com etambutol.....	36
Figura 18 - Placa de 96 poços com Coenzima Q ₁₀ nanoestruturada e Coenzima Q ₁₀ em pó.....	37
Figura 19 - Placa de 96 poços com Veículo nanoestruturado e DMF.....	38
Figura 20 - Placa de 96 poços com rifampicina, isoniazida, controle do DMF e controle negativo.....	39
Figura 21 - Placa de 96 poços com etambutol.....	40
Figura 22 - Placa de 96 poços com Coenzima Q ₁₀ nanoestruturada e Coenzima Q ₁₀ em pó.....	41
Figura 23 - Placa de 96 poços com Veículo nanoestruturado e DMF.....	42

Figura 24 - Placa de 96 poços com rifampicina e veículo nanoestruturado.....	43
Figura 25 - Placa de 96 poços com isoniazida e Coenzima Q ₁₀ nanoestruturada.....	46
Figura 26 - Placa de 96 poços com etambutol e Coenzima Q ₁₀ em pó.....	47
Figura 27 - Placa de 96 poços de fundo redondo com isoniazida e rifampicina.....	49
Figura 28 - Placa de 96 poços de fundo redondo com Coenzima Q ₁₀ nanoestruturada e seu veículo...	51
Figura 29 - Placa de 96 poços de fundo redondo com Coenzima Q ₁₀ em pó.....	53

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Esquema básico de tratamento da TB em adultos e adolescentes (≥ 10 anos).....	14
Tabela 2 – Esquema básico de tratamento da TB em crianças (< 10 anos).....	14
Tabela 3 - Melhores resultados do Virtual Screening.....	26
Gráfico 1 - Curva de crescimento bacteriano na presença de Coenzima Q ₁₀ nanoestruturada, Coenzima Q ₁₀ pó e Veículo nanoestruturado.....	45
Gráfico 2 - Curva de crescimento bacteriano nos testes de Rifampicina e Isoniazida.....	45
Gráfico 3 - Curva de crescimento bacteriano na presença de etambutol.....	48
Gráfico 4 - Curva de crescimento bacteriano na presença de isoniazida e rifampicina.....	50
Gráfico 5 - Curva de crescimento bacteriano na presença Coenzima Q ₁₀ nanoestruturada, Coenzima Q ₁₀ pó e Veículo nanoestruturado.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

API – Active Pharmaceuticals Ingredients (Insumo Farmacêutico Ativo)

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

BK - Bacilo de Koch

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CoQ₁₀ nano – Coenzima Q₁₀ nanoestruturada

CoQ₁₀ pó – Coenzima Q₁₀ em pó

DMF – Dimetilformamida

DO₆₀₀ – Densidade óptica 600nm

EMB – Etambutol

INH – Isoniazida

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

KatG – Enzima catalase-peroxidase

LACEN-DF – Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal

MABA – Microplate Alamar Blue Assay

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDB – Protein Data Bank

PncA – Enzima nicotinamidase/pirazinamidase

POA – Ácido pirazinóico

PYR – Pirazinamida

QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship

RIF – Rifampicina

RMSD – Root Mean Square Deviation

TB – Tuberculose

Vn – Veículo nanoestruturado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Tuberculose	12
1.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
1.1.2 Tratamentos e Resistência	13
1.1.2.1 Rifampicina	14
1.1.2.2 Isoniazida.....	15
1.1.2.3 Abandono ao tratamento	16
1.2 Reposicionamento de fármacos.....	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Avaliação <i>in silico</i>	20
3.1.1 Confecção do banco de ligantes	20
3.1.2 Virtual Screening (VS)	21
3.1.3 Docking	21
3.1.4 Validação	21
3.2 Avaliação <i>in vitro</i>	21
3.2.1 Materiais.....	21
3.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	22
3.2.2.1 Resazurina.....	22
3.2.2.2 Preparação do Inóculo	23
3.2.2.2.1 Inóculo 1	24
3.2.2.2.2 Inóculo 2	24
3.2.2.2.3 Inóculo 3	24
3.2.2.3 Diluição dos medicamentos.....	24
3.2.2.3.1 Testes 1 e 2.....	24
3.2.2.3.2 Teste 3	25
3.2.2.3.3 Teste 4	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Avaliação <i>in silico</i>	26
4.1.1 Obtenção do banco de dados	26
4.1.2 Virtual screening	26
4.1.3 Docking	27
4.1.4 Validação	28
4.2 Coenzima Q ₁₀	29
4.2.1 Nanoemulsão	31
4.3 Avaliação <i>in vitro</i> – Concentração Inibitória Mínima	33

4.3.1	Teste 1	33
4.3.2	Teste 2	39
4.3.3	Teste 3	43
4.3.4	Teste 4	49
5.	CONCLUSÃO	54
6.	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

Tuberculose (TB) caracteriza-se por ser uma doença infectocontagiosa com acometimento prioritariamente pulmonar e laríngeo, causada pela *Mycobacterium tuberculosis* (CHEVALIER *et al.*, 2014). Sua disseminação ocorre por via respiratória, através de aerossóis contaminados com bacilos liberados pela pessoa infectada, por meio da fala, tosse ou espirro (GAGNEUX, 2018). Dessa forma, as bactérias alcançam o trato respiratório do hospedeiro, especialmente os alvéolos pulmonares, e lá encontram ambiente propício à sua multiplicação, o que culmina na primo-infecção (KOCH; MIZRAHI, 2018). Ademais, existe a possibilidade de inalação do bacilo e este apresentar baixa proliferação, não causando os sintomas da doença, mesmo ele permanecendo no organismo, o que é denominado tuberculose latente (GETAHUN *et al.*, 2015).

Deve-se destacar a possibilidade da doença se manifestar em regiões extrapulmonares, como a região extra pleural, sistema nervoso central, sistema geniturinário, bem como ossos e articulações, culminando em uma série de manifestações atípicas (KR *et al.*, 2013). Outra relevância clínica está no fato de a TB ser uma das principais causas de coinfeção em pacientes imunocomprometidos, especialmente em pacientes portadores vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DIEDRICH; O'HERN; WILKINSON, 2016). Essa coinfeção pode ser ocasionada pela reativação de tuberculose latente ou por uma resposta imunológica deficiente (BOSCO DE OLIVEIRA; MARÍN-LEÓN; CORRÊA CARDOSO, 2004).

Apesar de ser uma doença milenar e de acometimento em todo mundo, somente em 1882 seu agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis*, tornou-se conhecido por meio dos estudos do médico patologista e bacteriologista alemão, Heinrich Hermann Robert Koch. Ainda hoje, a TB permanece como um problema de saúde pública, fato corroborado em 1993, quando um elevado aumento no número de casos da doença levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar essa enfermidade como uma emergência mundial. Estimativas sugerem que, no ano de 2015, cerca de 10,4 milhões de pessoas desenvolveram a doença, tendo os países asiáticos, africanos e pertencentes à América Latina e do Sul como principais contribuintes para essa estatística. Nesse cenário, o Brasil é um importante reservatório e disseminador da doença, estando entre os 30 países com alta carga para tuberculose (BRASIL, 2019).

Ao longo dos tempos, a tuberculose tem-se mostrado uma doença negligenciada, principalmente por estar concentrada em países em desenvolvimento e, segue como uma das 10 maiores causas de morte mundial. Até a recente pandemia da COVID-19, a tuberculose liderava a mortalidade por um único agente infeccioso (WHO, 2021).

Tendo em vista a íntima relação dessa enfermidade com condições precárias de vida, estratégias multisetoriais são usadas como formas de enfrentamento da moléstia, as quais incluem ações de controle da doença, fortalecimento de compromisso político, ações de proteção social aos pacientes, acesso universal à saúde e valorização e incorporação de novas tecnologias (BRASIL, 2019).

1.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis também chamado de Bacilo de Koch (BK) é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), aeróbio, não esporulado, que mede cerca de 0,2 a 0,6 µm de largura e 0,5 a 3 µm de comprimento e possui uma parede rica em lipídios (ácido micólico e arabinogalactano). Por conter uma parede espessa e apolar, existe uma dificuldade em encontrar medicamentos que consigam ter ação contra a bactéria (S. CAMPOS, 2006; BRASIL, 2005).

Uma das formas de diagnóstico laboratorial da tuberculose é na pesquisa dos bacilos álcool-ácido resistentes baciloscopia por coloração de Ziehl-Nielsen, que consiste em colocar uma distensão do escarro do paciente em uma lâmina e corá-la (tratá-la) com fucsina, aquecer para que a fucsina penetre na membrana da bactéria e depois lavá-la com álcool. Considerando que é uma bactéria álcool resistente, o corante permanecerá na parede bacteriana e não no restante da placa, permitindo assim a visualização dos bacilos (BRASIL, 2021). Outras formas de diagnóstico são por teste rápido molecular (TRM-TB, GeneXpert®) que consiste em um exame que detecta partes do DNA bacteriano, como o gene *rpoB*, cultura em meio sólido Ogawa-Kudoh e em meio líquido pelo sistema BD BACTEC™ MGIT™, que consegue detectar o bacilo da micobactéria. Com o cultivo da bactéria é possível a realização dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos como: estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol (KR *et al.*, 2013; BD, 2019).

1.1.2 Tratamentos e Resistência

Os esquemas de tratamento para TB são padronizados (Tabela 1 e 2), sendo que o esquema básico (1ª linha) consiste na utilização de uma combinação 2 meses de Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH), Pirazinamida (PYR) e Etambutol (EMB), e depois mais 4 meses de Rifampicina e Isoniazida (2RHZE/4RH) (PELOQUIN; DAVIES, 2021). Ainda que extremamente eficazes, o tratamento demanda longos períodos de adesão, com comparecimento à unidade de saúde regularmente, além da possibilidade de ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis. No entanto, uma grande preocupação gira em torno de bacilos multirresistentes, ou seja, aqueles que são inertes aos antimicrobianos de primeira escolha. Nesses casos, é necessário recorrer a outras drogas menos eficazes, como os das

classes dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, o que acarreta menor resposta ao agente agressor e maior chance de efeitos tóxicos (SEUNG; KESHAVJEE; RICH, 2015).

Tabela 1 – Esquema básico de tratamento da TB em adultos e adolescentes (≥ 10 anos).

Regime	Fármacos	Faixa de peso	Unidade/dose	Meses
2RHZE Fase intensiva	RHZE 150 mg/75 mg/400 mg/275 mg comprimido em dose fixa combinada	20 kg a 35 kg	2 comprimidos	2
		36 kg a 50 kg	3 comprimidos	
		> 50 kg	4 comprimidos	
4RH Fase de manutenção	RH Comprimido ou cápsula 300 mg/200 mg ou 150 mg/100 mg	20 kg a 35 kg	1 comp. ou caps. 300 mg/200 mg	4
		36 kg a 50 kg	1 comprimido ou cápsula 300 mg/ 200mg + 1 comprimido ou cápsula 150/100 mg	
		> 50 kg	2 comprimidos ou cápsulas 300 mg/200 mg	

Fonte: BRASIL, 2011.

Tabela 2 – Esquema básico de tratamento da TB em crianças (<10 anos).

Fases do tratamento	Fármacos	Peso do doente			
		Até 20 kg	>21 kg a 35 kg	>36 kg a 45 kg	> 45 kg
		mg/kg/dia	mg/dia	mg/dia	mg/dia
2 RHZ Fase de ataque	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	Z	35	1000	1500	2000
4RH Fase de manutenção	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400

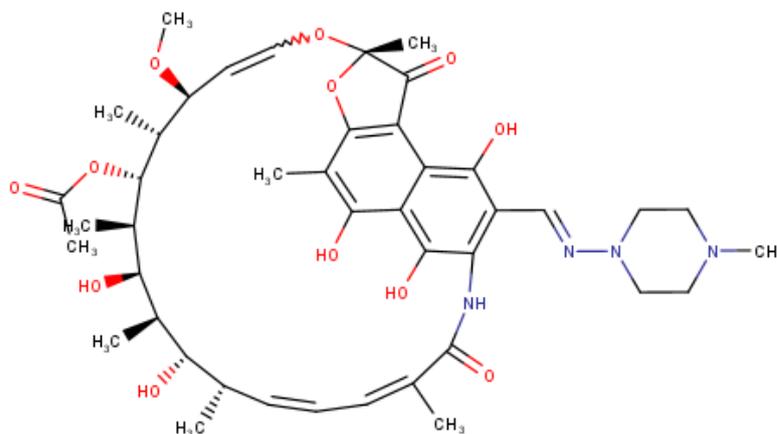
Fonte: BRASIL, 2011.

1.1.2.1 Rifampicina

A rifampicina ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ – IUPAC: [(7S,9E,11S,12R,13S,14R,15R,16R,17S,18S,19E,21Z)-2,15,17,27,29-pentahydroxy-11-methoxy-3,7,12,14,16,18,22-heptamethyl-26-[(E)-(4-methylpiperazin-1-yl)iminomethyl]-6,23-dioxo-8,30-dioxa-24-azatetracyclo[23.3.1.14,7.05,28]triaconta-1(29),2,4,9,19,21,25,27-octaen-13-yl] acetate) (Figura 1) é um antimicrobiano derivado semissintético da rifamicina B, da classe de antibiótico macrocíclico de melhor ação entre os medicamentos de primeira linha (NIEMI *et al.*, 2003). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da transcrição por ligação a subunidade β da RNA polimerase dependente de DNA. Os efeitos colaterais incluem hepatotoxicidade, reações dermatológicas, distúrbios neurológicos e gastrointestinais (PHARMACIE *et al.*, 2016). Infelizmente, a resistência à RIF está surgindo dia após dia seja pela dificuldade de adesão devido aos efeitos colaterais e longo tempo de tratamento, ou por mutação do alvo molecular. O desenvolvimento de resistência RIF envolve quase

exclusivamente mutações da região central do gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase (rpoB) (CAMPBELL *et al.*, 2001). Mais de 96% das cepas resistentes à rifampicina têm uma mutação dentro desta região central, composta por 81 pares. Dessa forma, é possível identificar cepas resistentes de uma maneira relativamente simples (SOMOSKOVI; PARSONS; SALFINGER, 2001).

Figura 1: Estrutura molecular da rifampicina.



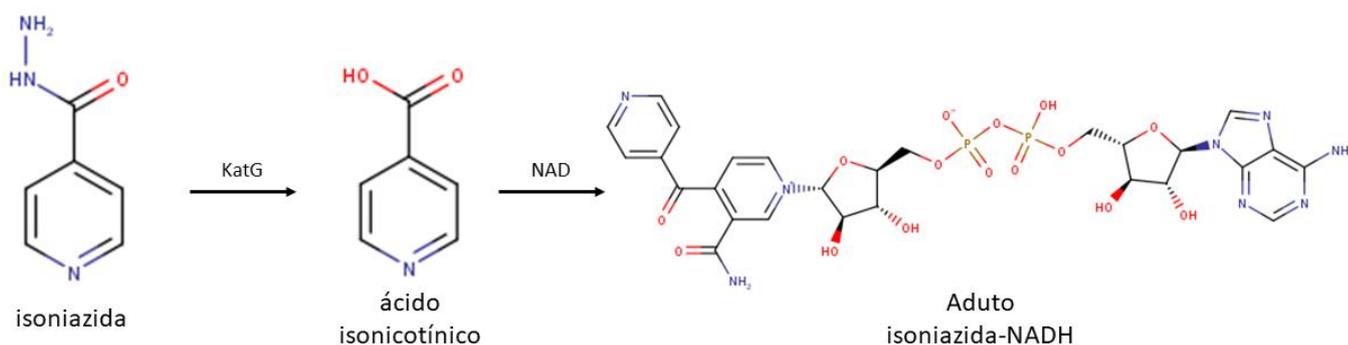
Fonte: MarvinSketch©

1.1.2.2 Isoniazida

A isoniazida (C₆H₇N₃O – IUPAC: pyridine-4-carbohydrazide) (Figura 2) é um antibiótico derivado sintético do ácido isonicotínico utilizado como anti-tuberculostático desde 1952. Corresponde a uma pró-droga que requer uma ativação oxidativa pela enzima catalase-peroxidase (KatG) na Mtb formando o ácido isonicotínico, que reage com a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), gerando o aduto INH-NADH (PELOQUIN; DAVIES, 2021). Seu mecanismo consiste na inibição da proteína transportadora enoil-acil (enoil-ACP) redutase *InhA*, enzima dependente de NADH do sistema ácido graxo sintase do tipo II (Fatty Acid Synthase type II - FAS-II) que catalisa a última etapa redutiva do alongamento de ácidos graxos (CHOLLET *et al.*, 2015).

O principal mecanismo de resistência se dá pela modificação de resíduos como Ser315Thr, His108, Ala110Val, Asp137, da enzima KatG, impedindo a conversão do pró-fármaco a sua forma ativa (ZHAO *et al.*, 2013). Ademais, mutações nas regiões reguladoras do gene *InhA* também conferem um importante mecanismo de resistência a isoniazida, principalmente na alteração da citosina por timina na posição -15, levando a uma superexpressão do gene *InhA* (RAMASWAMY; MUSSER, 1998). (RAMASWAMY; MUSSER, 1998).

Figura 2: Conversão da isoniazida em sua forma ativa.



1.1.2.3 Abandono ao tratamento

Em 2019, 12% dos casos novos de Tuberculose sensível abandonaram o tratamento, porcentagem mais que duas vezes superior ao 5% recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Essa taxa é ainda maior para indivíduos resistentes aos fármacos, sendo de 27,8% (BRASIL, 2019). Portanto, verifica-se a necessidade da descoberta de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose. Nesse contexto, uma alternativa encontrada para a descoberta de “novos” medicamentos para essa doença é o reposicionamento de fármacos.

1.2 Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento de fármacos consiste no estudo sobre medicamentos já utilizados clinicamente que tem por finalidade a descoberta de novos usos e aplicações terapêuticas que eles possam ter. Há décadas esse conceito vem sendo utilizado para o desenvolvimento de novos tratamentos, uma vez que auxilia na redução de tempo e recursos utilizados corriqueiramente durante as etapas de fase I e II da pesquisa clínica, apesar de manter praticamente as mesmas dificuldades encontradas durante as fases III e IV das etapas regulatórias (NOSENGO, 2016).

Historicamente, inúmeros medicamentos obtiveram novas recomendações de uso. O rituximabe, que originalmente era utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer por ser um anticorpo monoclonal, atualmente também serve para tratar artrite reumatoide; o topiramato, a princípio indicado para o tratamento de epilepsia, agora auxilia no controle da obesidade; e o minoxidil, inicialmente utilizado para o tratamento da hipertensão, no presente é utilizado para queda de cabelo (PUSHPAKOM *et al.*, 2018).

Com a finalidade otimizar o processo de reposicionamento de fármacos, a indústria farmacêutica tem feito o uso da metodologia *in silico* para selecionar os medicamentos mais promissores e somente esses são utilizados para os testes *in vitro*. Essa abordagem consiste no uso de

ferramentas computacionais que simulam o processo biológico real, evitando desperdícios de tempo e dinheiro, e maximizando a identificação de entidades químicas qualificadas (MODA, 2011).

Embora não seja uma técnica nova, o método *in silico* se tornou mais conhecido recentemente com a pandemia, que levou a uma corrida para encontrar algum medicamento que funcionasse contra a COVID-19 (SHECHTER *et al.*, 2017). Como exemplo, pode-se citar a testagem de medicamentos anti-HIV em estrutura proteica de SARS-CoV-2, que resultou na descoberta de dois possíveis inibidores de protease terem efeito no vírus, porém estudos *in vitro* são necessários para a confirmação dessa hipótese (ANCY; SIVANANDAM; KUMARADHAS, 2020).

É possível realizar uma triagem de várias moléculas em um alvo de interesse para verificar se há afinidade entre algum fármaco e o sítio ativo de alguma estrutura proteica. A primeira parte é a varredura virtual baseada em ligante (ligand-based virtual screening), que necessita de uma estrutura tridimensional de um determinado alvo disponível para posterior avaliação da interação com ligantes, baseando-se nos descritores químicos dos possíveis sítios de interação do alvo. A segunda é a varredura virtual baseada em estrutura (structure-based virtual screening), que utiliza uma base de dados de moléculas para análises que irão correlacionar sua estrutura molecular e atividade farmacológica, utilizando ferramentas de avaliação de similaridade baseadas em QSAR (do inglês quantitative structure-activity relationship), por exemplo (MAGANTI; GRANDHI; GHOSHAL, 2016).

Atualmente, existem vários softwares de predição de interação fármaco-alvo disponíveis, como GLIDE, AutoDock, Schrodinger program suit LLC ou GOLD, que necessitam de uma estrutura molecular em 3D dos fármacos, que podem ser encontrados em bancos de moléculas como o DrugBank, PubChem ou ZINC, e estrutura proteica cristalizada dos alvos de interesse, disponível no Protein Data Bank (PDB) (TIMO *et al.*, 2019).

De forma geral, o virtual screening (VS) (termo em inglês para “varredura virtual”) é uma análise capaz de incorporar milhares ou até mesmo milhões de moléculas e realizar a interação com alvos proteicos para verificação de afinidade molecular, com o objetivo final de propor um mecanismo de ligação entre alvo e ligante (MAGANTI; GRANDHI; GHOSHAL, 2016).

Após a realização do virtual screening, é necessário a verificação dos resultados obtidos *in silico* por meio de ensaios *in vitro*. O teste *in vitro* age como uma confirmação da atividade biológica predita pelo método virtual e pode ser realizada de inúmeras maneiras (TIMO *et al.*, 2019). A metodologia mais utilizada é a análise da concentração inibitória mínima (CIM, ou MIC, do inglês minimum inhibitory concentration). Por definição, é a concentração mínima de um determinado

composto que é capaz de inibir o crescimento bacteriano. Este teste é bastante eficaz na confirmação da atividade biológica prevista *in silico* (KRISHNASAMY *et al.*, 2016).

Considerando o exposto, surgiu a motivação da busca por um fármaco já disponível no mercado que possa ter interação com a *Mycobacterium tuberculosis*, inibindo seu crescimento. Sendo assim, para alcançar esse propósito foram utilizadas ferramentas computacionais (testes *in silico*) de modo a selecionar os compostos mais prováveis de gerar o resultado esperado. Feito isso, foram realizados testes *in vitro* para identificar se as opções selecionadas realmente são capazes de cumprir com sua função.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Realizar testes *in silico* de fármacos já disponíveis comercialmente com a finalidade de selecionar quais são as moléculas que apresentam maior probabilidade de ter atividade sobre a RNA polimerase do *Mycobacterium tuberculosis* e, então, testar *in vitro* somente o melhor candidato obtido nessa simulação computacional.

2.2 Objetivos Específicos

- Criar um banco de moléculas formado por medicamentos já disponíveis no mercado.
- Realizar o virtual screening do banco de molécula nos alvos da rifampicina, a RNA polimerase e da isoniazida, a enoil-ACP redutase, de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Realizar o docking molecular dos melhores candidatos para obtenção da função de scoring da interação ligante-alvo.
- Avaliar qual a melhor metodologia de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em cepa H37Ra.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação *in silico*

3.1.1 Confeção do banco de ligantes

Considerando que o estudo se baseou em um reposicionamento de fármacos, foi confeccionado um banco de moléculas de medicamentos já existentes no mercado. Para isso, foi utilizada a base de dados Integrity[®] (Clarivate Analytics) por meio do acesso CaFe do portal Periódicos CAPES (site: https://integrity-clarivate.ez54.periodicos.capes.gov.br/integrity/xmlxsl/pk_home.util_home). Como forma de selecionar moléculas com potencial de desenvolvimento, na aba “Drugs and Biologics” foram especificados alguns parâmetros para os filtros disponibilizados. O Peso Molecular foi limitado a faixa de 0 a 1000 kDa, para evitar moléculas ou proteínas muito grandes, pois quanto maior seu tamanho mais difícil se torna o transporte intermembrana do medicamento. No critério Maior Fase de Desenvolvimento especificou-se a busca por estruturas já lançadas ou registradas no mercado, que passaram da fase III de desenvolvimento (Figura 3). O resultado da busca foi exportado para uma planilha de excel.

Figura 3: filtros utilizados para a confecção da base de ligantes.

The screenshot displays the Integrity database search interface. The top navigation bar includes the Integrity logo, 'A Cortellis solution', and 'Drugs & Biologics'. Below the navigation bar, there are tabs for 'Advanced Search' and 'Session History', along with 'Clear Form' and 'Start' buttons. The main search area is divided into several sections: 'Product', 'Reference', 'Targets & Pathways', and 'Patent'. Each section contains search criteria with input fields and 'Index' and 'AND' buttons. The 'Product' section includes filters for 'Lead Compounds' and 'Under Active Development', with specific values for 'Molecular Weight' (From 0 to 1000) and 'Highest Phase' ('Registered' or 'Launched'). The 'Reference', 'Targets & Pathways', and 'Patent' sections each have 'Select Value' and 'Optional Value' fields. On the left side, there is a sidebar with 'Knowledge Areas' and a 'Quick Search' bar. Below the sidebar, there are sections for 'The Starting Line', 'Pipeline on the Move', and 'Gateways to Development Status', each with a brief description and a 'Lookup' button. At the bottom of the sidebar, there is a list of medical conditions: AIDS, Cancer, Cardiovascular Disorders, Congenital defects, Critical care medicine, and Dermatological Disorders.

A partir da lista de medicamentos fornecida pelo Integrity[®], todas as moléculas foram extraídas em formato .sdf na plataforma PubChem[®] (site: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) para

compor o banco de dados. Então, otimizou-se essas estruturas no aplicativo MarvinSketch® (site: <https://chemaxon.com/products/marvin>).

3.1.2 Virtual Screening (VS)

Os alvos proteicos foram selecionados a partir dos alvos dos medicamentos de primeira linha da doença e de suas disponibilidades no banco de dados de estruturas de proteínas PDB (site: <https://www.rcsb.org/>). Com isso, foi testado o PDB 6CCV, que corresponde a estrutura cristalizada do complexo de iniciação da transcrição da RNA polimerase de *Mycobacterium smegmatis*, com a presença do seu inibidor, a rifampicina, considerando que sua resolução de 3.05Å confere resultados mais fidedignos, e o PDB 4TRO, equivalente a estrutura da enoil-ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis* InhA, na presença do seu inibidor, o metabólito ativo da isoniazida, a uma resolução de 1.40Å. A resolução escolhida está relacionada à distância mínima em que os átomos conseguem ser vistos e identificados, quanto menor o valor em Ångstroms (Å), mais detalhada a imagem, logo sua resolução é melhor (MERK *et al.*, 2016).

3.1.3 Docking

O docking também segue as mesmas características do VS, porém com uma menor quantidade de moléculas e maior flexibilização das ligações, o que gera mais possibilidades de conformações de um fármaco dentro da proteína.

3.1.4 Validação

Os mesmos princípios utilizados para o docking servem para a validação, porém, esta serve para verificar se a metodologia utilizada é confiável. Para isto, é feito um teste com o medicamento que corresponde ao alvo de interesse na proteína, verificando se ela consegue manter a sua conformação de acordo com a cristalização. Então é feita uma sobreposição entre o fármaco cristalizado e o fármaco adicionado. O resultado é dado numérico em Root Mean Square Deviation (RMSD) que é o desvio quadrático médio, utilizado para medir a diferença geométrica entre os modelos selecionados (COUTSIAS; WESTER, 2019).

3.2 Avaliação *in vitro*

3.2.1 Materiais

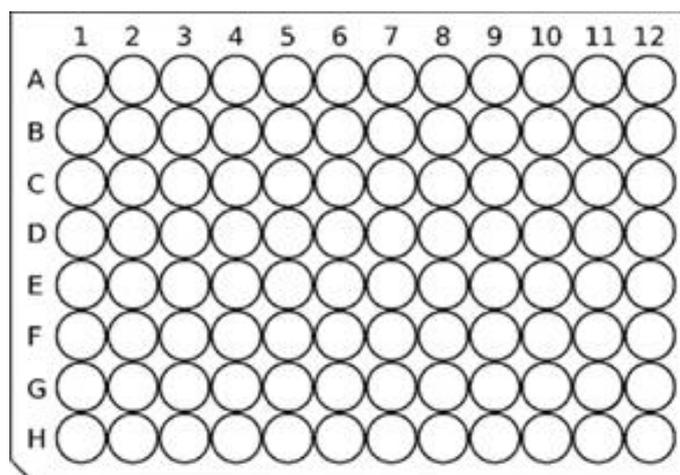
Os materiais utilizados para a realização dos teste *in vitro* foram: bactéria *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Ra fornecida pelo Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF); Dimetilformamida (DMF) para a diluição inicial dos medicamentos de primeira linha da tuberculose; rifampicina; isoniazida; pirazinamida; etambutol; corante resazurina; meio de crescimento MGIT;

tubos de escala McFarland 0.5 e 1; água destilada; placas de 96 poços de fundo chato (KASVI K12-096) e de fundo redondo (KASVI K30-5096U); seringas; filtros para seringas 0,22 micra; pipetas de 20 µL a 1000 µL; luvas; tubos criogênicos; tubos estéreis com esferas de vidro; tubos estéreis; pipeta estéril; alça estéril; salina estéril; meio 7H9; e formalina 10%.

3.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a realização dos testes *in vitro* foi escolhida a metodologia de Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando a técnica de Ensaio de Microplaca Alamar Blue (Microplate Alamar Blue Assay - MABA) em placa de 96 poços (Figura 4). A CIM consiste na menor concentração de um determinado antimicrobiano, expressa em mg/L ou em molar, que inibe o crescimento de um microrganismo em teste, sob condições *in vitro*, durante um intervalo de tempo definido (BONA *et al.*, 2014). Sendo assim, foram feitas diferentes diluições dos medicamentos de interesse e essas são testadas na bactéria a fim de se encontrar a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano (CHO; LEE; FRANZBLAU, 2015).

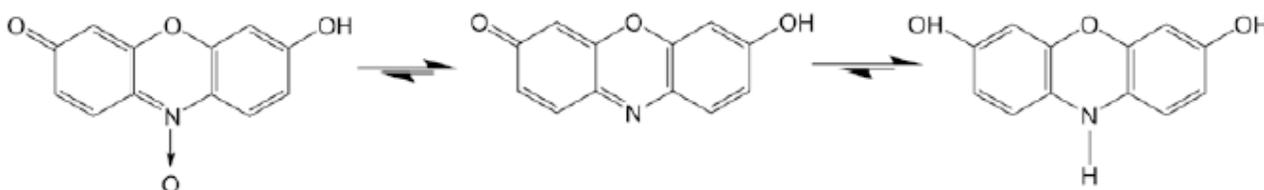
Figura 4: Placa de 96 poços com colunas de 1 a 12 e fileiras de A a H.



3.2.2.1 Resazurina

A resazurina é um corante utilizado para identificação de viabilidade celular. Ela sofre uma reação de redução ao entrar em contato com NADH/NADPH desidrogenase (Figura 5), sendo convertida em resorufina, alterando sua coloração de azul para rosa em menos de 24 horas (Präbst *et al.*, 2017).

Figura 5: Resazurina sendo reduzida a resorufina e posteriormente a dihidroresorufina (Präbst *et al.*, 2017).



É uma metodologia simples e de baixo custo para a verificação de concentração inibitória mínima pois é visível a olho nu, porém também existe a possibilidade de analisar por meio de absorbância calculando a porcentagem de redução da resazurina (Figura 6) (PRÄBST; ENGELHARDT; RINGGELER, 2017).

Figura 6: Equação da porcentagem de redução da resazurina.

$$\frac{(O2 * A1) - (O1 * A2)}{(O2 * P1) - (O1 * P2)}$$

O2 - Coef. Ext. Molar resazurina oxidada - 600nm = 117216; **A1** - Absorbância em 570nm; **O1** - Coef. Ext. Molar resazurina oxidada - 570nm = 80586; **A2** - Absorbância em 600nm; **P1** - Absor. Contr. Positivo a 570nm; e **P2** - Absor. Contr. Positivo a 600 nm.

Outra forma de verificar a porcentagem de crescimento bacteriano em placa de 96 poços com resazurina é por fluorescência, utilizando como configuração da leitora de microplaca feixes de emissão a 590nm e excitação a 540nm (Figura 7) (RAMPERSAD, 2012).

Figura 7: Equação da porcentagem de redução da resazurina.

$$\frac{T1 - M1}{M2 - M1} * 100$$

T1 – Resultado da fluorescência do poço; **M1** – Média do controle do meio de cultura; **M2** – Média do controle positivo.

3.2.2.2 Preparação do Inóculo

A preparação do inóculo foi realizada de três formas distintas, uma vez que não se encontrou na literatura qual seria melhor para o teste em análise. Sendo assim, comparou-se os resultados encontrados para determinar qual é o de maior confiabilidade para o trabalho em questão.

Foram testadas três formas diferentes de preparação do inóculo, considerando ser este um passo pouco descrito na literatura, mas que é reconhecido na prática como sendo fundamental para a obtenção de resultados mais confiáveis.

3.2.2.2.1 Inóculo 1

No primeiro teste e no segundo, a preparação dos inóculos foi realizada retirando a bactéria do meio de crescimento sólido Ogawa-Kudoh e adicionando em meio MGIT até a obtenção da escala 1 McFarland (3×10^8 ufc/mL) (CINU *et al.*, 2019).

3.2.2.2.2 Inóculo 2

Foi adotada uma nova metodologia de preparação de inóculo para o terceiro teste da forma como o próprio fabricante do meio MGIT recomenda (BECTON DICKINSON – BD[®]), a qual consiste utilizar o MGIT para a diluição do inóculo até atingir um padrão 0,5 McFarland e diluir um em salina estéril.

3.2.2.2.3 Inóculo 3

Já para o quarto teste foi inoculado 100µL da cepa H37Ra em 8mL de meio 7H9 e mantido em crescimento por 15 dias. Após esse período, foi retirada uma alíquota e verificado a sua densidade óptica em 600nm (DO₆₀₀) em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®] Genesys 20) (REHBERG *et al.*, 2019).

3.2.2.3 Diluição dos medicamentos

3.2.2.3.1 Testes 1 e 2

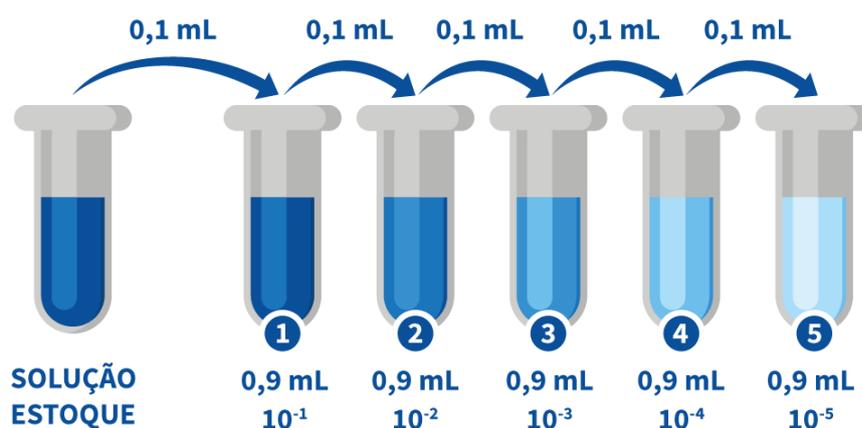
Nos testes 1 e 2 os medicamentos foram diluídos de acordo com a concentração de cada um dos poços. As placas foram mantidas em incubação a 37°C em ambiente aerado por 6 dias e o volume total a ser colocado nas placas foi de 200µL, sendo 100µL das soluções e 100µL do inóculo. Os poços ao redor da placa foram preenchidos com 300µL de água destilada para evitar o ressecamento dos poços dos testes. No 7º dia, foram adicionados 12,5µL de Tween-80 20% e 20µL de resazurina 0,01% e incubado por mais 24 horas. A mudança de coloração de azul para rosa é considerada indicação do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*.

Também se realizou uma verificação da dimetilformamida (DMF) para identificar quais concentrações poderiam ser utilizadas sem causar morte bacteriana, considerando que seria utilizado para a diluição dos medicamentos. Com isso foram feitas diluições do DMF em meio MGIT nas diluições de 50, 20, 10, 5 e 1%.

3.2.2.3.2 Teste 3

No teste 3 foi alterada a metodologia de diluição do inóculo, seguindo a forma como o próprio fabricante do meio de cultura descreve em bula e também como os medicamentos são diluídos, não sendo mais uma diluição para cada poço e sim uma solução estoque de maior concentração no primeiro poço e as concentrações seguintes obtidas de forma seriada, conforme exemplo seguinte (Figura 8).

Figura 8: Como é realizada uma diluição seriada.



Fonte: Adaptado de Kasvi®

Nesse sentido, realizou-se a diluição da maior concentração dos medicamentos isoniazida e rifampicina (8 µg/mL), etambutol (32 µg/mL), coenzima Q₁₀ nanoemulsão e em pó, e veículo da nanoemulsão (100 µg/mL). Foram adicionados na primeira coluna 200µL e no restante dos poços 100µL de MGIT. Em sequência, foi realizada uma diluição seriada nos poços posteriores.

3.2.2.3.3 Teste 4

No quarto teste as concentrações de isoniazida e rifampicina na primeira coluna foram de 20 µM, as de coenzima Q₁₀ nanoemulsão e coenzima Q₁₀ pó foram de 2 mM, e o veículo nanoemulsão teve concentração equivalente à quantidade presente no medicamento. Nesse ensaio foram adicionados 100 µL de solução no primeiro poço e 50 µL de 7H9 nos demais. Então, foi feita uma diluição seriada retirando-se 50 µL do primeiro poço e passando para os próximos, mas no último foram descartados 50 µL de solução. Em sequência, houve a adição de 50 µL de inóculo e as placas foram incubadas a 37°C. No 5º dia, foram adicionados 10 µl de resazurina 0,01% e as placas reincubados por mais 24 horas. Após esse tempo, foram adicionados 100 µL de formalina 10%, que possui ação bactericida e de fixação, permitindo que a placa fosse retirada do laboratório evitando o perigo de contaminação, e, então, realizada a leitura de fluorescência das placas (REHBERG *et al.*, 2019).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação *in silico*

4.1.1 Obtenção do banco de dados

O banco de dados montado a partir do Integrity[®], contendo somente fármacos já aprovados para comercialização ou em fase final de aprovação regulatória foi elaborado com 1813 fármacos (lista completa no Anexo I).

4.1.2 Virtual screening

O resultado dos VS's realizados com o alvo RNA Polimerase da *Mycobacterium smegmatis* (PDB: 6CCV) e Enoil-ACP-Redutase da *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 4TRO) encontra-se na Tabela 3. Em ambos os alvos a molécula com maior score obtido no VS foi a Coenzima Q₁₀ (ubidecarenona).

Tabela 3: Melhores resultados do Virtual Screening.

6CCV		4TRO	
Fármaco	CHEMPLP	Fármaco	CHEMPLP
Coenzima Q ₁₀	102,71	Coenzima Q ₁₀	147,82
Venetoclax	93,18	Cobicistat	125,99
Tocoretinato	91,82	Fenilbutirato de glicerol	118,69
Deferoxamina	91,62	Visomitina	115,34
Daclatasvir	90,95	Carfilzomibe	112,94

4.1.3 Docking

Considerando o resultado do VS, concentramos os esforços na Coenzima Q₁₀. Para confirmar o resultado obtido, realizamos a docagem molecular com alta flexibilidade dentro do algoritmo genético (GA, do inglês “Genetic Algorithm”). Os scores obtidos foram ainda maiores do que os valores gerados pelo VS (PLP.Fitness de 116.9797 quando docado com a RNA polimerase e 150.2912 com a InhA), demonstrando que há ainda mais interações entre a molécula testada e o sítio ativo quando maior a flexibilização da estrutura molecular (Figuras 9 e 10).

Figura 9: Coenzima Q₁₀ docada na RNA polimerase.

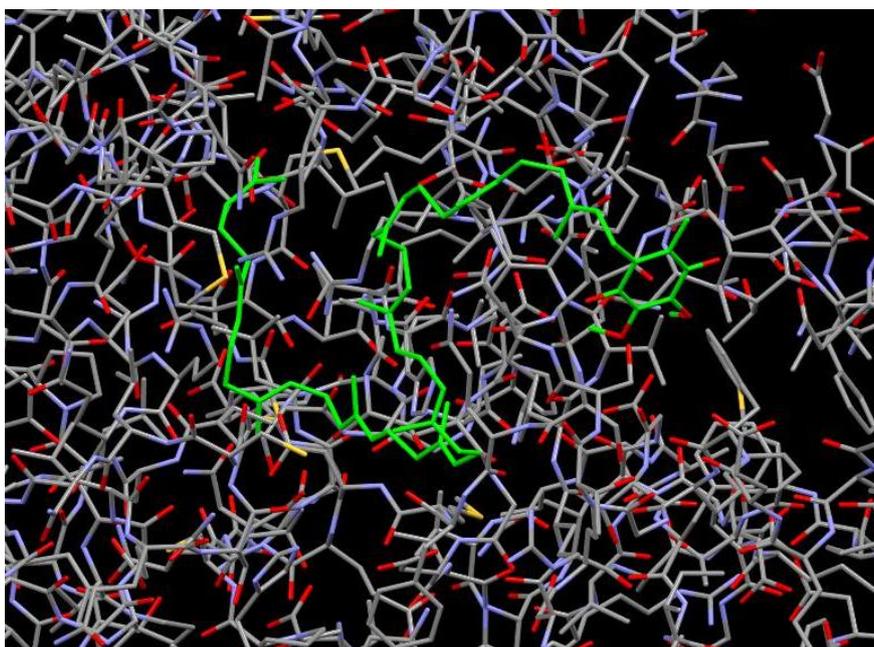
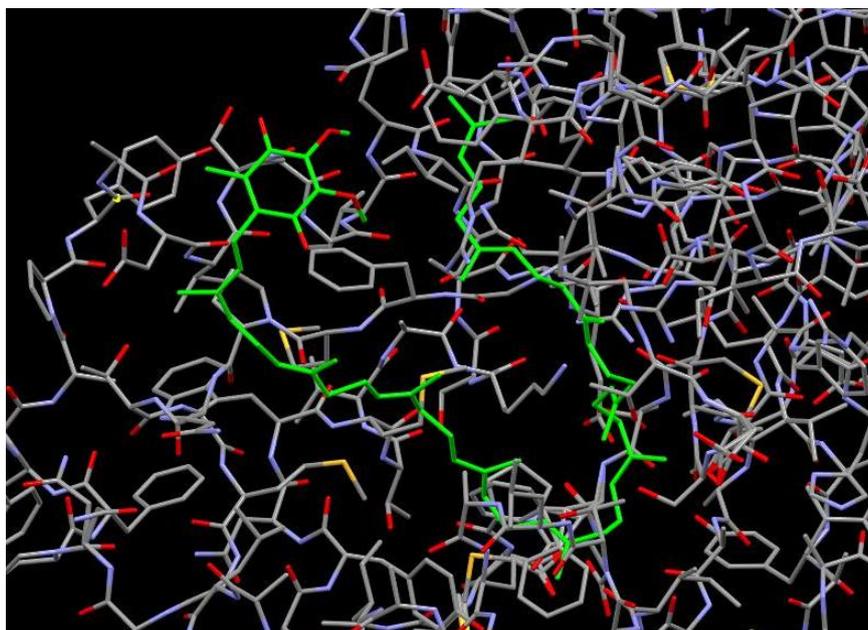


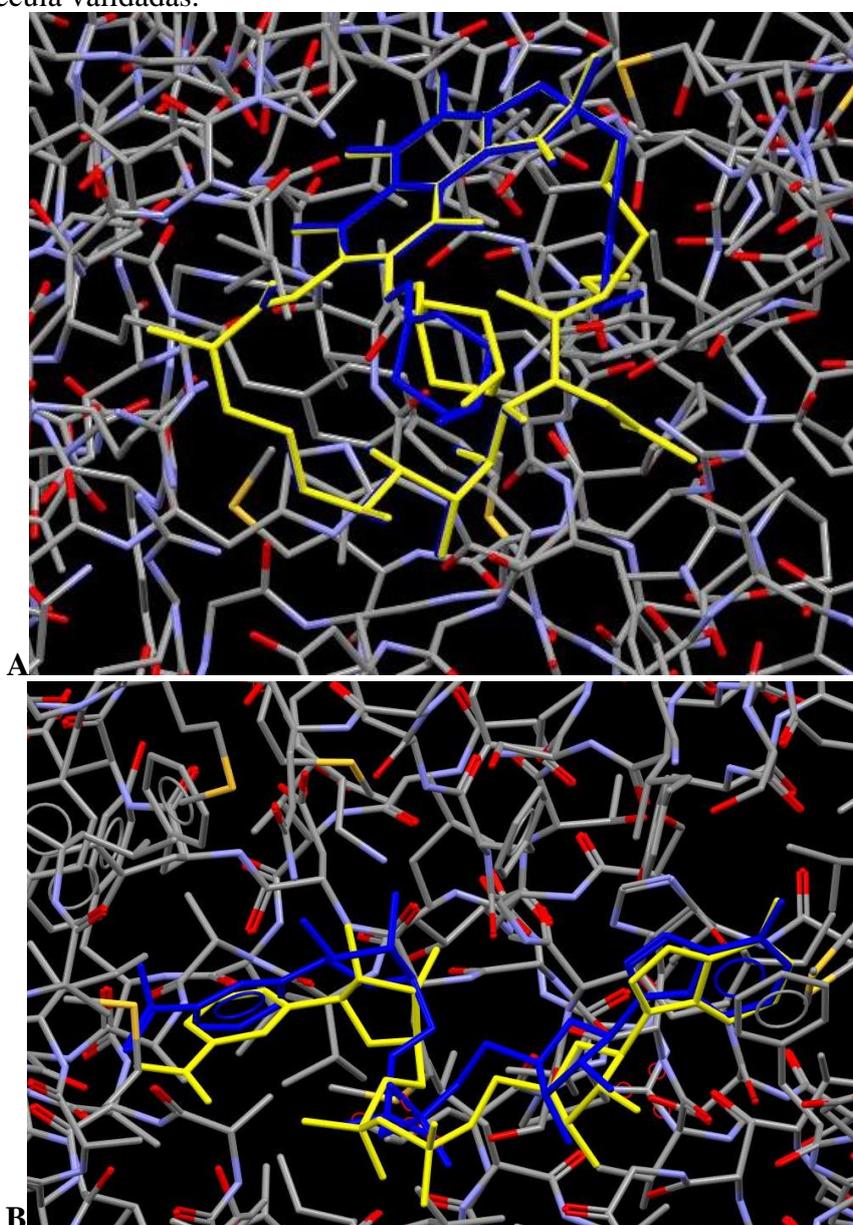
Figura 10: Coenzima Q₁₀ docada na Enoil-ACP-Redutase.



4.1.4 Validação

Durante a realização da validação da proteína 6CCV, foi inserida a própria rifampicina no seu sítio ativo para comparar a com a posição da rifampicina cristalizada. Com isso é dado um valor de desvio médio entre as duas conformações dos fármacos, o valor de RMSD, que foi de 1.050Å na proteína 6CCV (Figura 11). O mesmo foi realizado na proteína 4TRO, colocando a isoniazida em avaliação e seu RMSD foi de 1.30Å (COUTSIAS; WESTER, 2019). Esses valores são aceitáveis, visto que quanto mais próximo de 1Å, maior a sobreposição entre as moléculas, logo mais próximas as conformações dos átomos da molécula docada e da molécula cristalizada, sinalizando que a estrutura docada é capaz de atingir a localização da estrutura original (JAIN, 2008).

Figura 11: Molécula validadas.

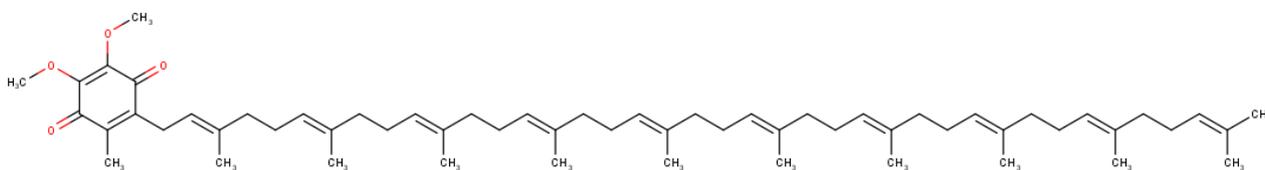


Legenda: A: rifampicina (azul) sobreposta a rifampicina cristalizada (amarelo); B: isoniazida (azul) sobreposta a rifampicina cristalizada (amarelo).

4.2 Coenzima Q₁₀

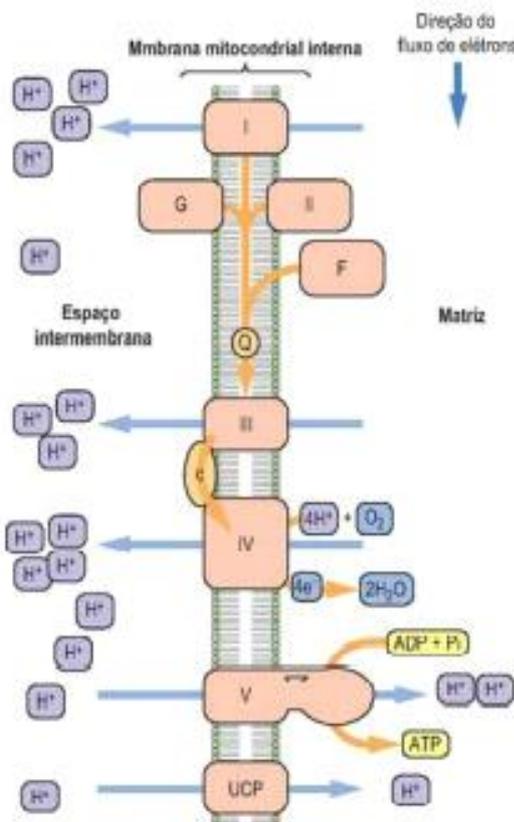
A coenzima Q₁₀ ou Ubiquinona (C₅₉H₉₀O₄ – IUPAC: 2-[(2E,6E,10E,14E,18E,22E,26E,30E,34E)-3,7,11,15,19,23,27,31,35,39-decamethyltetraconta-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-decaenyl]-5,6-dimethoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione) (Figura 12) é uma molécula lipofílica presente nas membranas celulares e principalmente na mitocôndria, constituída por um grupo quinona e uma cauda com 10 unidades de isopreno (HIDAKA *et al.*, 2008). É considerada uma molécula antioxidante e atua na cadeia respiratória como transportadora de elétrons (ARENAS-JAL; SUÑÉ-NEGRE; GARCÍA-MONTOYA, 2020).

Figura 12: Estrutura molecular da Coenzima Q₁₀.



A Ubiquinona atua como peça fundamental da membrana mitocondrial interna (Figura 13). Ela é o primeiro membro da via comum da cadeia transportadora de elétrons na qual ocorrem sucessivas reações de oxirredução, que culminam na produção de ATP (fonte de energia) para uso celular em suas mais diversas funções (MEHRABANI; ARAB, 2019).

Figura 13: Uma seção da membrana interna mitocondrial com o sistema de transporte de elétrons e ATP sintase.



Legenda: I, complexo I; II, complexo II; III, complexo III; IV, complexo IV; V, complexo V ou ATP sintase; G, glicerol 3-fosfato desidrogenase; F, acil CoA desidrogenase; Q, ubiquinona; c, citocromo c; UCP, proteína desacopladora. Fonte: BAYNES, JOHN W.; DOMINICZAK, 2010

Juntamente com outros componentes, sua principal função consiste em receber elétrons das quatro principais flavoproteínas mitocondriais e os transferir para o complexo III (QH2-citocromo c redutase). A ubiquinona pode carrear tanto um quanto dois elétrons e considera-se ser a maior fonte de radicais superóxidos na célula. Essa molécula é encontrada em mitocôndrias presentes em vários órgãos, dentre eles, coração, fígado, rins e músculos esqueléticos e sua produção endógena depende do metabolismo do colesterol que, dentre as mais diversas substâncias formadas, também origina a Ubiquinona (ACOSTA *et al.*, 2016).

Defeitos do metabolismo da coenzima Q₁₀ causados por mutações tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial, em especial os que envolvam a biossíntese deste componente, podem culminar em doenças mitocondriais, as quais possibilitam o acúmulo do ácido lático e a morte celular, especialmente nos músculos esquelético (miopatias), cardíaco (cardiomiopatias) e nos nervos (encefalopatias), todos os quais são fortemente dependentes do metabolismo oxidativo (GARRIDO-MARAVÉ *et al.*, 2014). Deve-se ressaltar que, o acúmulo de lactato, devido ao metabolismo

anaeróbio da glicose, no líquido cefalorraquidiano sugere um defeito no metabolismo oxidativo mitocondrial por deficiência da coenzima Q₁₀, que pode levar a um quadro de fraqueza muscular, progressiva, convulsões e encefalopatia. Nesse caso, o tratamento com coenzima Q₁₀ é validado para melhora do quadro de fraqueza muscular (TAYLOR, 2017).

Farmacologicamente, a coenzima Q₁₀ é utilizada na forma de suplemento nutricional e atua como um potente antioxidante, tendo sua maior relevância na manutenção da função muscular saudável, seja ela esquelética ou cardíaca. Nesse sentido, a maioria dos estudos têm sido direcionados para doenças relacionadas ao mau funcionamento miocárdico, como insuficiências cardíacas com redução da fração de ejeção e cardiopatias isquêmicas, nas quais a administração deste suplemento mostrou melhora da função da musculatura miocárdica (BONAKDAR; GUARNERI, 2005).

Outra linha de pesquisa, relaciona o uso de estatinas com o decréscimo dos níveis de coenzima Q₁₀ endógenos, uma vez que a redução do colesterol inibe a enzima HMG-CoA redutase necessária à síntese de ubiquinona. Nesse sentido, a utilização da coenzima se justificaria com base na prevenção de uma possível miopatia induzida por estatinas (QU *et al.*, 2018).

Sua utilização farmacológica em casos de reposição de níveis endógenos baixos prioriza a dose de 30mg/dia de coenzima Q₁₀. Para fins de efeitos cardíacos, a posologia recomendada é de 100 a 600 mg/dia administrados em duas a três doses diárias. No geral, não há efeitos adversos significativos quando essa substância é utilizada em doses de até 3.000 mg/dia. Dentre os sintomas relatados, destacam-se distúrbios gastrointestinais como diarreia, náuseas, azia e anorexia, com incidência inferior a 1%. Em casos mais raros, pode ocorrer exantema maculo papular e trombocitopenia. Pode interagir com varfarina (anticoagulante), tendo em vista a sua semelhança estrutural com a vitamina K (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

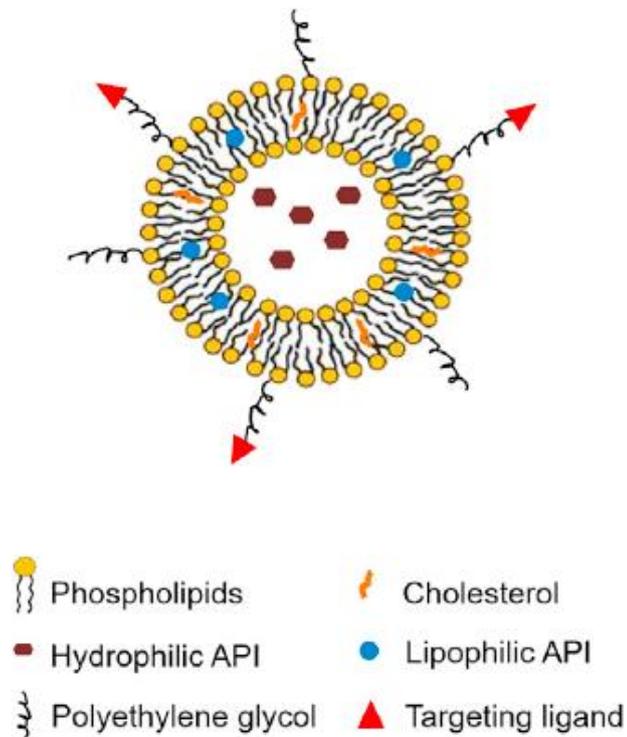
Relacionando a Coenzima Q₁₀ com a Mtb, um estudo publicado em 1962 sugere que a CoQ₁₀ estimule o crescimento bacteriano por meio da sua atuação no metabolismo oxidativo (BROWN, 1962). Para os testes *in vitro* foram utilizadas duas apresentações da Coenzima Q₁₀, uma em pó, a qual é o medicamento pura, sem excipientes, e uma em nanoemulsão.

4.2.1 Nanoemulsão

Nanoemulsões são dispersões coloidais formadas pela dispersão de dois líquidos imiscíveis submetidos a agitação intensa e estabilizados por surfactantes, normalmente lecitina de soja ou de gema de ovo (SABJAN *et al.*, 2019). Podem ser translúcidos quando o glóbulo tiver um diâmetro menor que 200nm ou possuir aparência leitosa entre 200nm e 500nm (Figura 14)

(CAPEK, 2004). Também podem conter em sua formulação óleo de soja, de gergelim, de semente de algodão, de coco e de farelo de arroz (SINGH *et al.*, 2017).

Figura 14: Ilustração de uma partícula de nanoemulsão.



Legenda: API - Active Pharmaceutical Ingredients (Insumo Farmacêutico Ativo) Fonte: FAN; MARIOLI; ZHANG, 2021

São capazes de carrear fármacos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos. As suas vantagens consistem em possuir uma melhor solubilização, permitem doses mais eficazes dos medicamentos, podendo carregar moléculas maiores dentro da nanopartícula e ultrapassar as membranas celulares com mais facilidade, conferindo uma melhor biodisponibilidade oral do medicamento (SCIOLI MONTOTO; MURACA; RUIZ, 2020).

4.3 Avaliação *in vitro* – Concentração Inibitória Mínima

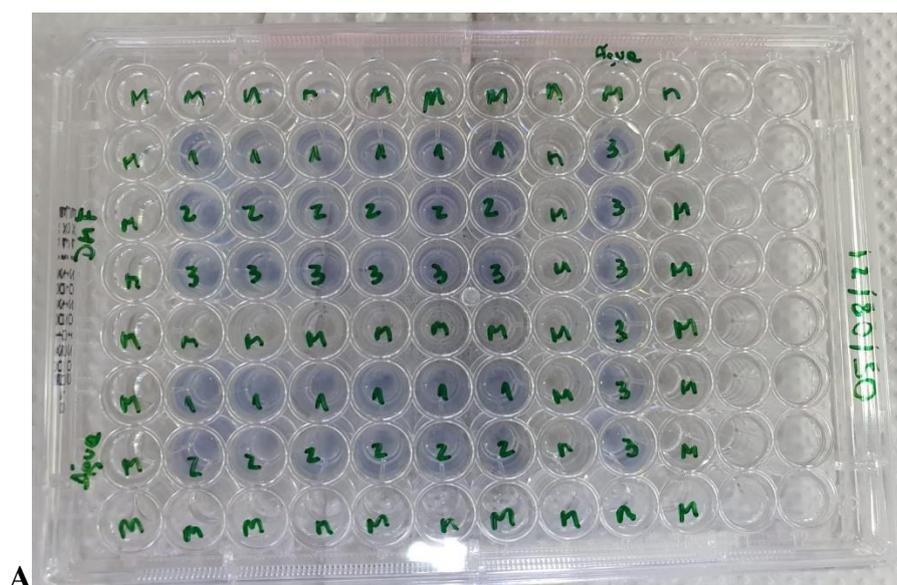
Considerando que os testes *in vitro* podem ser realizados de diferentes formas e não há uma padronização, foram realizadas algumas tentativas para encontrar a metodologia que mais se aproximasse da realidade das condições de trabalho. Durante a realização desta pesquisa, ocorreu a pandemia da COVID-19, o que impactou negativamente para a efetuação de mais testes, pois a maioria dos estabelecimentos foram fechados e/ou ficaram focados no combate à doença, não sendo possível a utilização desses locais.

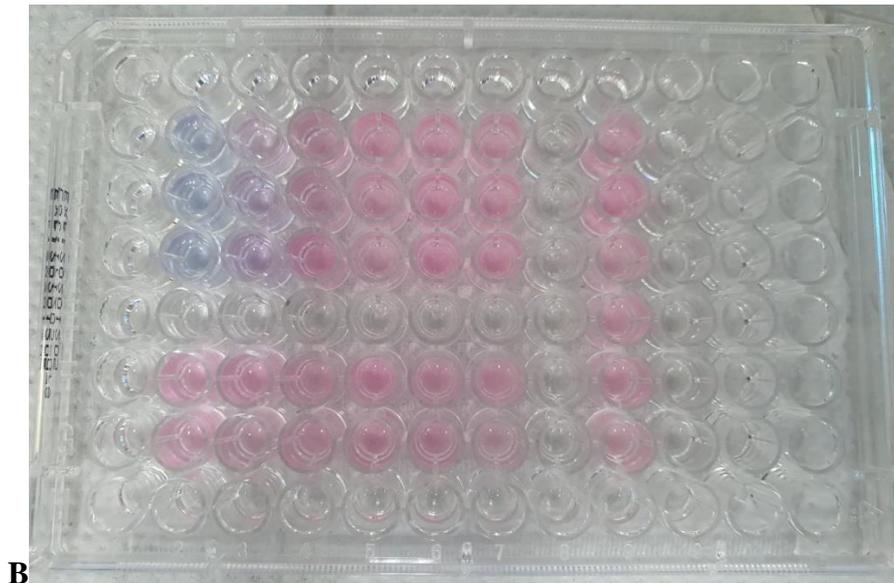
4.3.1 Teste 1

A princípio, os testes foram realizados utilizando a dimetilformamida como solvente de todos os medicamentos em pó, que foram a isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e coenzima Q₁₀. O único que não foi diluído com esse solvente foi a CoQ₁₀ nanoestruturada, pois já é uma solução polar, então foi possível ser diluída em água. O motivo principal da utilização do DMF foi o fato de a CoQ₁₀ em pó ser um produto de característica lipofílica, então foi necessário sua utilização para diluir o medicamento, considerando que, em baixas concentrações, não causaria a morte bacteriana (ONDARROA; SHARMA; QUINN, 1986).

Com isso, foi realizado o teste *in vitro* para a verificação da maior concentração que poderia ser utilizada de DMF sem que houvesse morte bacteriana (Figura 15).

Figura 15: Placa de 96 poços com DMF e água com a resazurina recém aplicada.

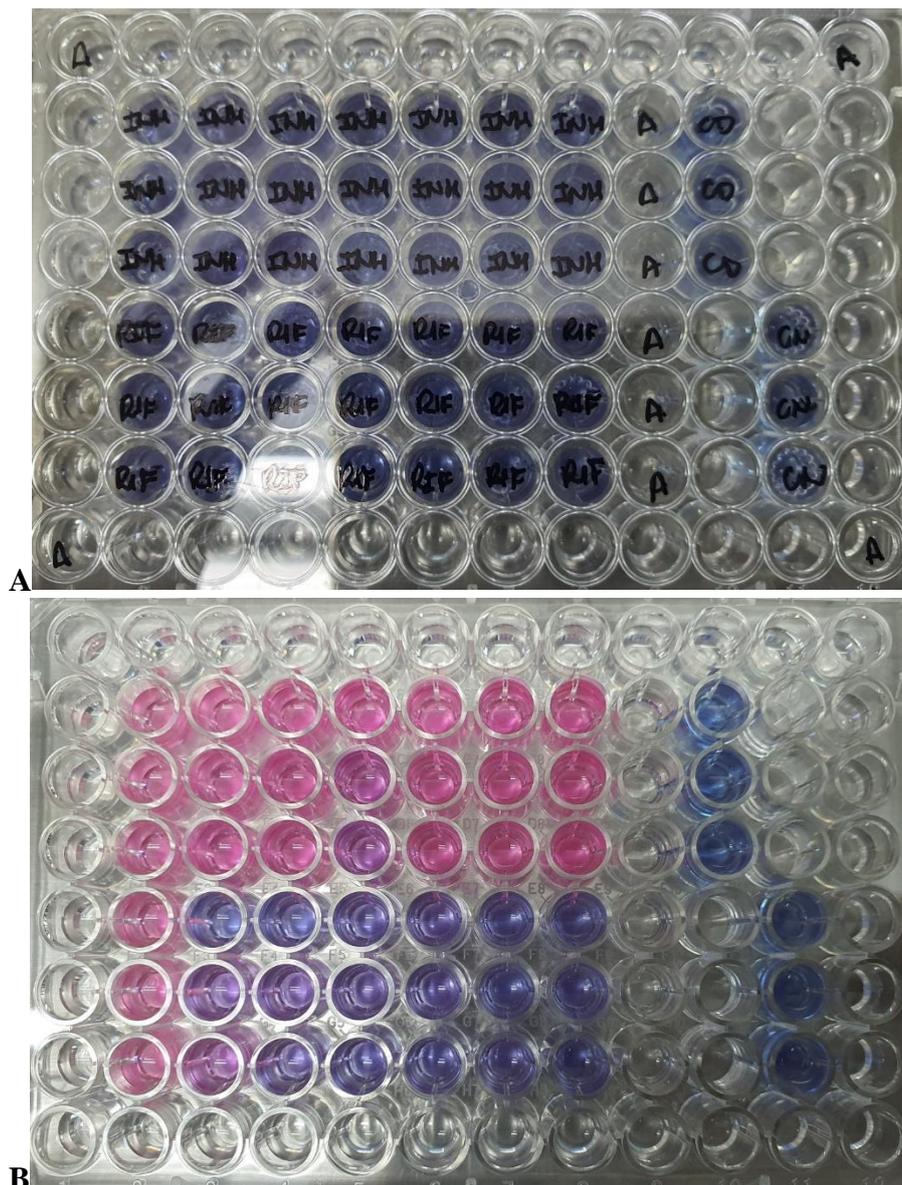




Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 2 a 7 diminui a concentração de DMF e de água: 25%; 10%; 5%; 2,5%; 0,5% e 0%. O mesmo acontece na coluna 9, porém da linha B à G.

Considerando a imagem anterior, as concentrações de 0 a 5% de DMF ficaram rosadas, o que significa que houve crescimento bacteriano. Já as concentrações de 10 e 25% ficaram azuladas, podendo ser inferido que houve morte bacteriana. Logo, foi considerada segura a utilização da concentração de DMF até 5%.

Figura 16: Placa de 96 poços com rifampicina, isoniazida, controle do DMF e controle negativo.

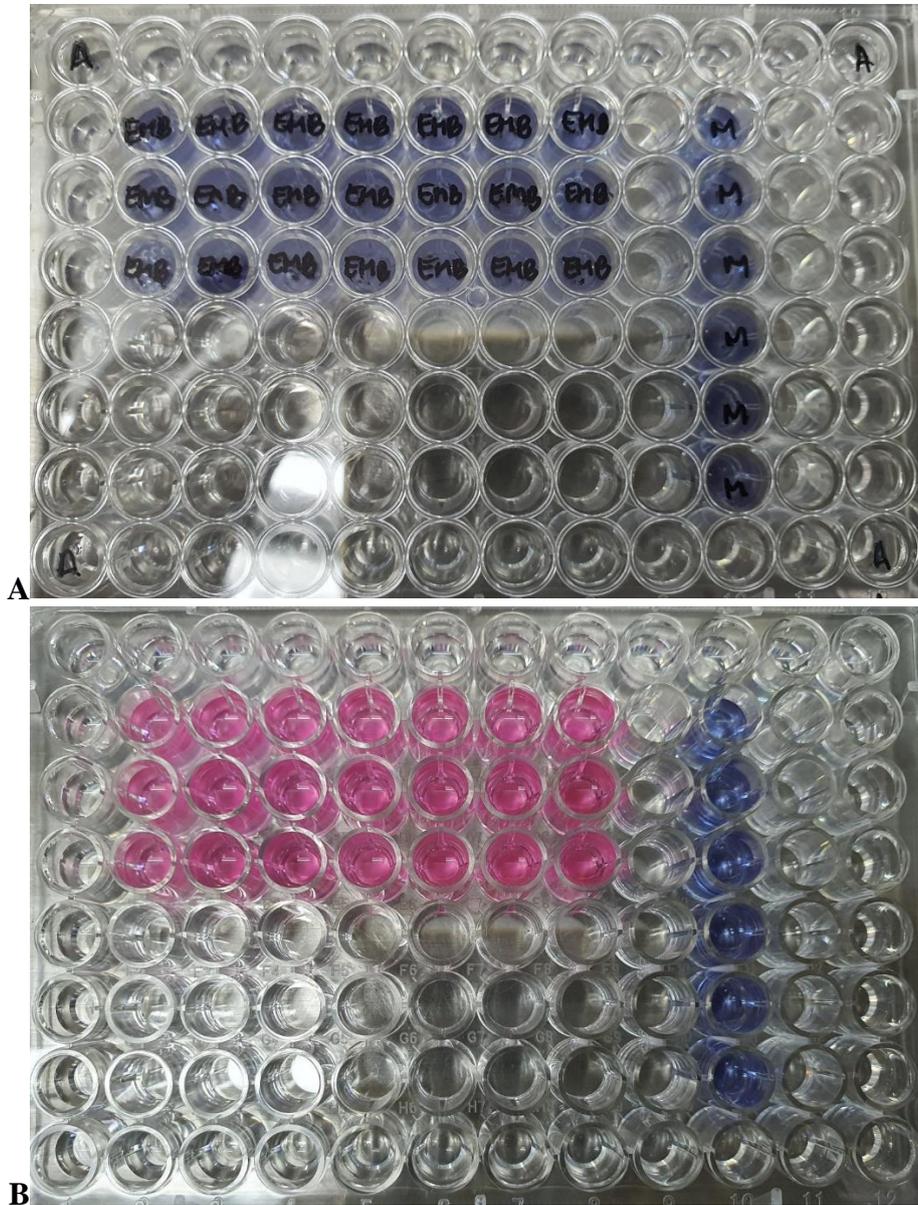


Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 3 a 8 aumentam as concentrações dos medicamentos, sendo a coluna 2 poços sem ativos (controle positivo). As concentrações de isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) são de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 ug/mL. O controle do DMF (CD) está a uma concentração de 5%. O controle negativo (CN) contém apenas MGIT.

A olho nu, houve a redução da resazurina entre os poços de isoniazida em todos os poços da que contém isoniazida, refutando-se que não foi encontrado o CIM entre as concentrações testadas e que não conseguiram eliminar uma quantidade significativa de bactérias. O mesmo ocorreu com a rifampicina porém todos os poços permaneceram azuis, os quais também não foi obtido o CIM, mas

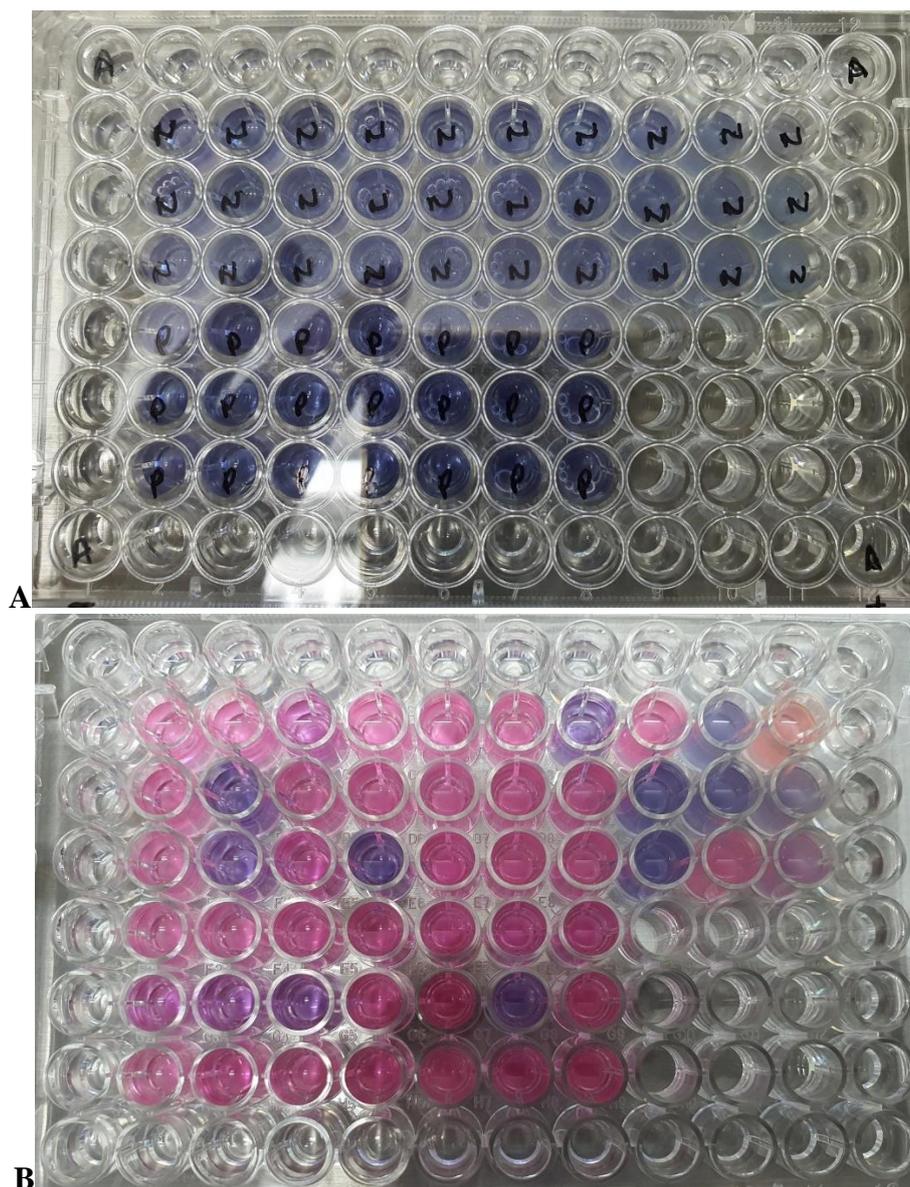
todas as concentrações conseguiram agir contra as bactérias (FIGURA 16). Situação semelhante a da isoniazida foi verificada com o etambutol (FIGURA 17).

Figura 17: Placa de 96 poços com etambutol.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 3 a 8 aumentam as concentrações dos medicamentos, sendo a coluna 2 poços sem ativos. As concentrações etambutol são de 1; 2; 4; 6; 8; e 16 $\mu\text{g/mL}$. Os poços da coluna 10 estão preenchidos apenas com MGIT.

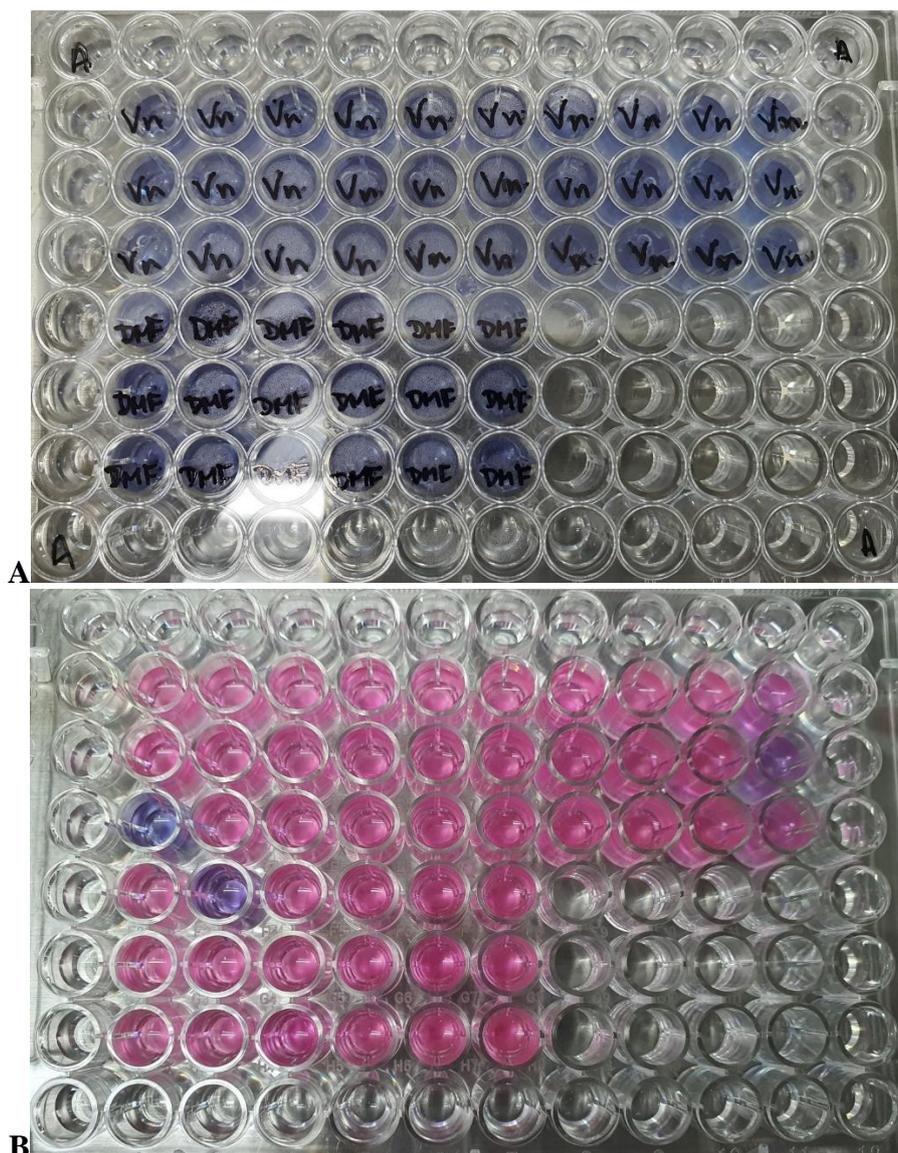
Figura 18: Placa de 96 poços com Coenzima Q₁₀ nanoestruturada e Coenzima Q₁₀ em pó.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 3 a 11 aumenta a concentração dos medicamentos, sendo a coluna 2 poços sem ativos. As concentrações de Coenzima Q₁₀ nanoestruturada (N) são de 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 250; 500; e 1mg/mL. A concentrações da Coenzima Q₁₀ pó (P) são de 1 a 50 μ g/mL.

No teste com a Coenzima Q₁₀ nanoestruturada e com a formulação em pó foi verificado um comportamento inesperado, considerando que alguns poços aleatórios mantiveram uma coloração azulada em diferentes concentrações, enquanto em outros da mesma coluna houve a redução do indicador (Figura 18).

Figura 19: Placa de 96 poços com Veículo nanoestruturado e DMF.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 3 a 11 aumenta a concentração dos medicamentos, sendo a coluna 2 poços sem ativos. As concentrações de Veículo nanoestruturado (Vn) são de 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 250; 500; e 1mg/mL. As concentrações de DMF são de 0,10; 0,25; 0,5; 1; e 2,5%.

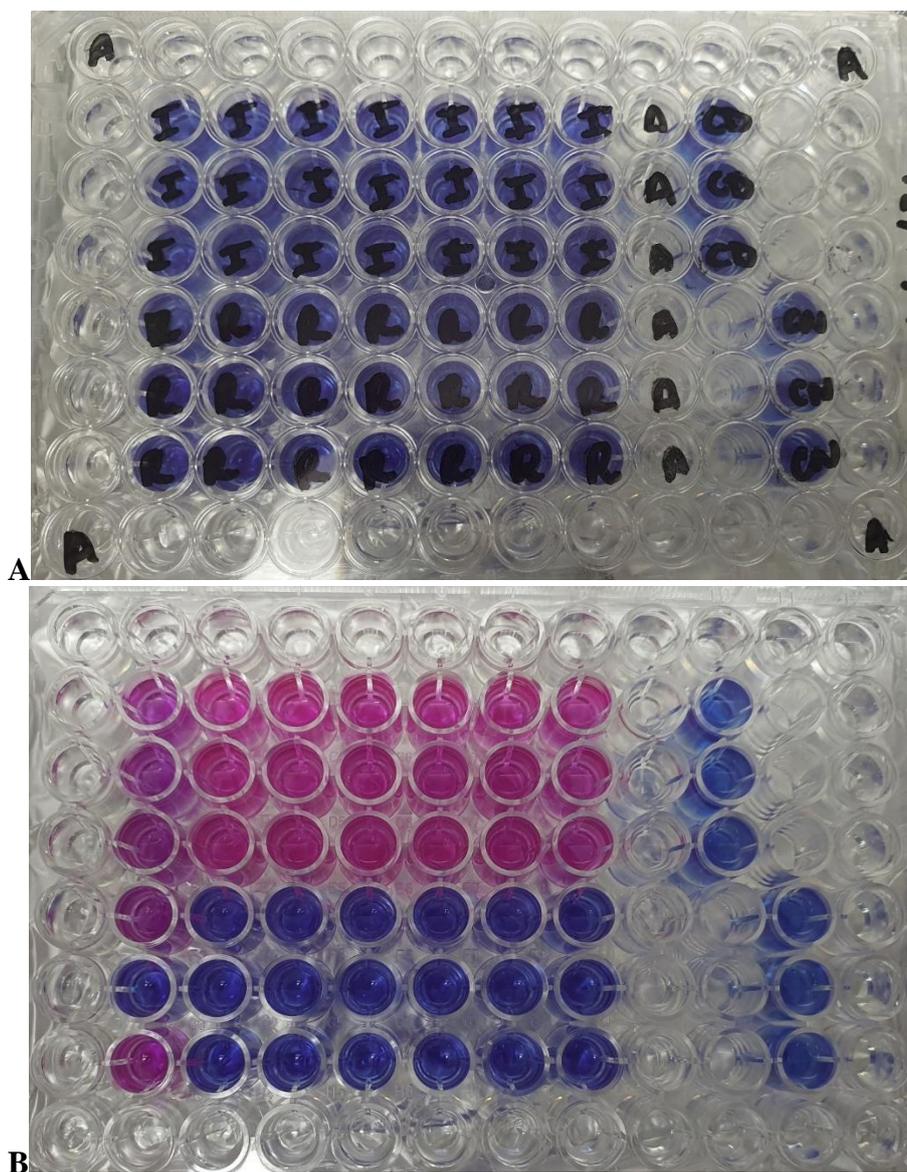
Seguindo essa metodologia, os CIMs esperados dos medicamentos de 1ª linha seriam em torno de 2 µg/mL para a RIF, 0,25 µg/mL para a INH e 4 µg/mL para o EMB, porém não foram obtidos esses resultados na prática (KILMER, 2010).

A maior parte da placa manteve um crescimento bacteriano, alterando a coloração de azul para rosa tanto nas concentrações de veículo nanoestruturado quanto nas concentrações de DMF (Figura 19). Nessas últimas duas placas, considerando que não foi encontrado um CIM e que alguns poços mantiveram a resazurina azulada, assumiu-se que poderia existir uma desigualdade na quantidade de

bactéria em cada pipetagem do inóculo. Diante do ocorrido, realizou-se outro teste com a mesma metodologia de diluição do inóculo, porém esperando por uma maior quantidade de tempo a fim de se ter uma maior homogeneidade na amostra.

4.3.2 Teste 2

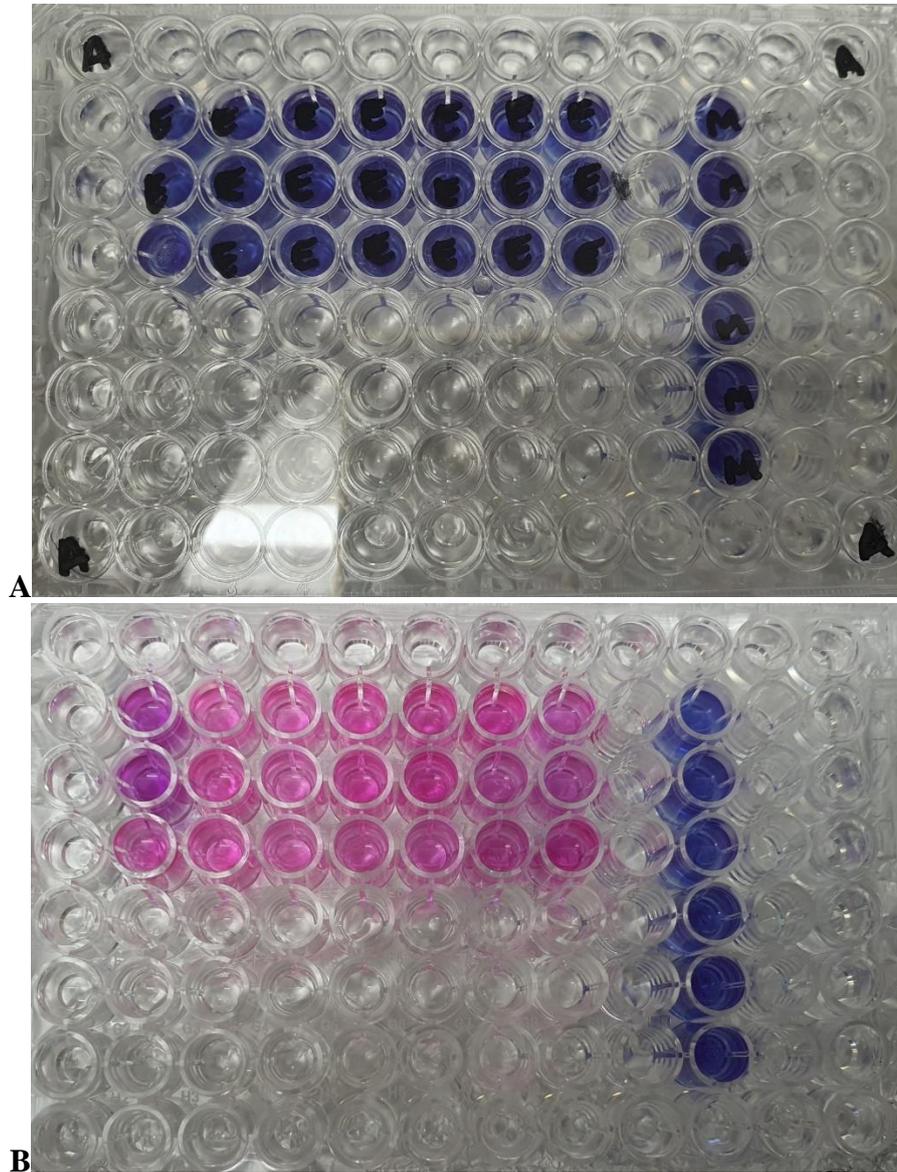
Figura 20: Placa de 96 poços com rifampicina, isoniazida, controle do DMF e controle negativo.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 3 a 8 aumentam as concentrações dos medicamentos, sendo a coluna 2 poços sem ativos (controle positivo). As concentrações de isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) são de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 ug/mL. O controle do DMF (CD) está a uma concentração de 5%. O controle negativo (CN) contém apenas MGIT.

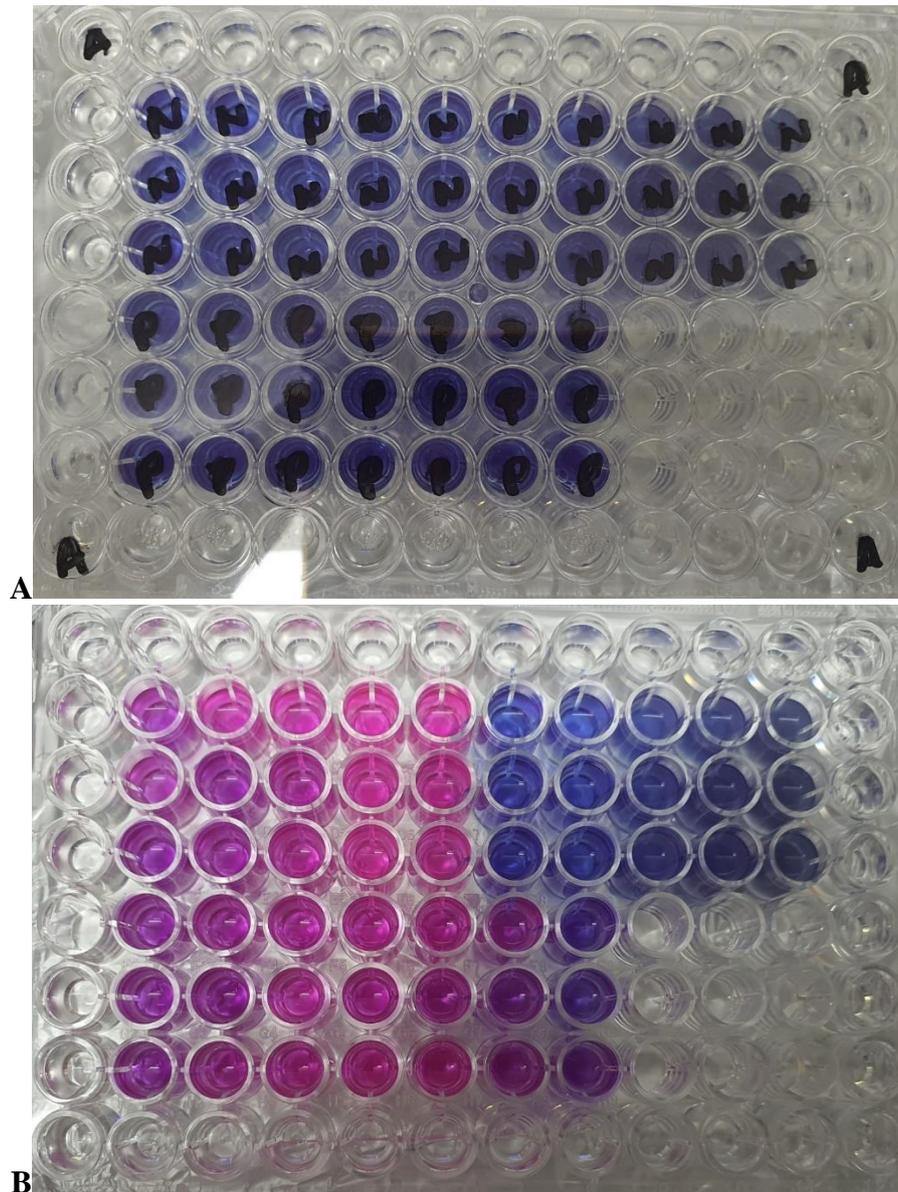
Uma nova tentativa foi realizada e manteve-se a resposta do teste anterior, tanto nas concentrações de isoniazida, quanto nas de rifampicina não foi encontrado o CIM, continuando todos os poços rosados e azulados, respectivamente (Figura 20). O mesmo ocorreu com o etambutol (Figura 21).

Figura 21: Placa de 96 poços com etambutol.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 3 a 8 aumentam as concentrações dos medicamentos, sendo a coluna 2 poços sem ativos. As concentrações etambutol são de 1; 2; 4; 6; 8; e 16 ug/mL. Os poços da coluna 10 estão preenchidos apenas com MGIT.

Figura 22: Placa de 96 poços com Coenzima Q₁₀ nanoestruturada e Coenzima Q₁₀ em pó.

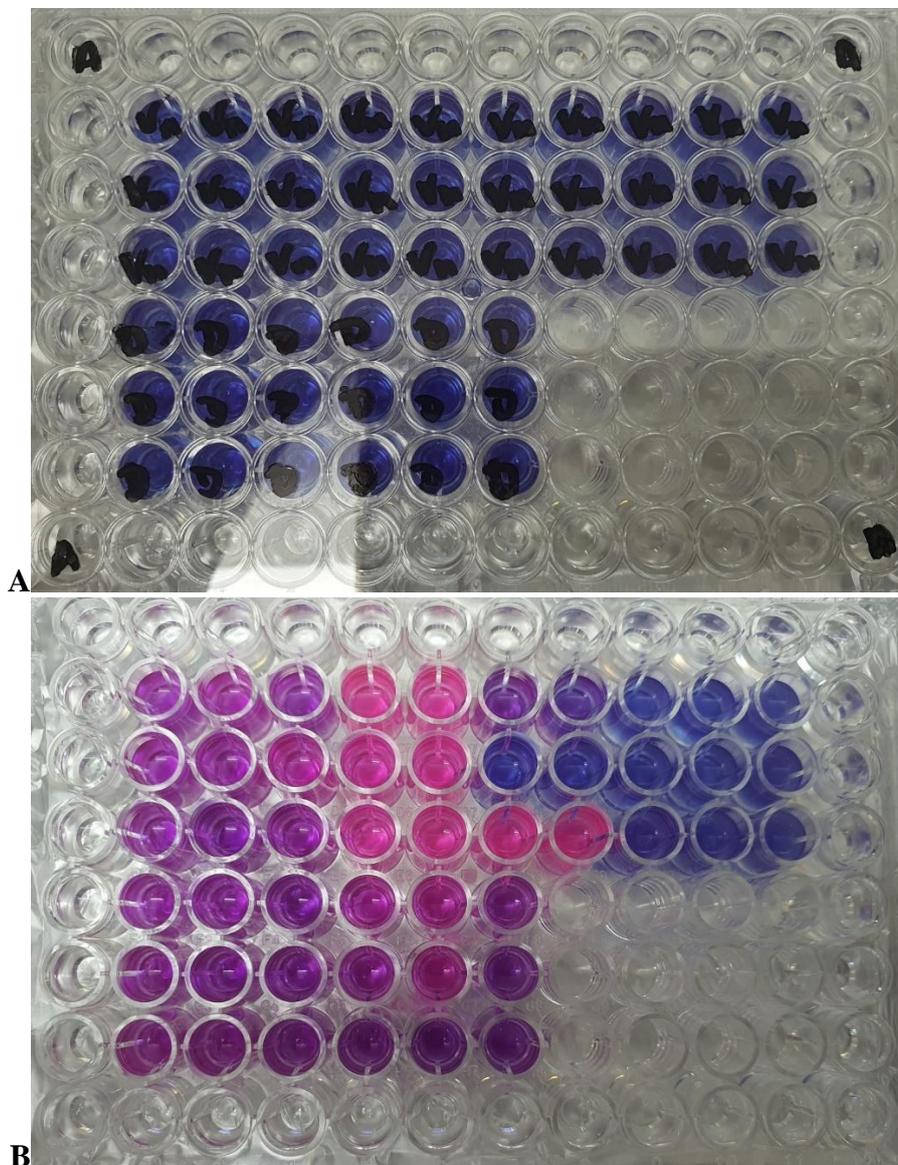


Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 3 a 11 aumenta a concentração dos medicamentos, sendo a coluna 2 poços sem ativos. As concentrações de Coenzima Q₁₀ nanoestruturada (N) são de 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 250; 500; e 1000 μ g/mL. As concentrações da Coenzima Q₁₀ pó (P) são de 1 a 50 μ g/mL.

Na placa de Coenzima Q₁₀ nanoestruturada e em pó houve um comportamento mais próximo ao que seria esperado dos medicamentos padrões da doença. Nas menores concentrações houve a transformação do indicador, e já nas concentrações a partir de 50 μ g/mL foi capaz de evitar o crescimento bacteriano. Não foi possível realizar o teste das 3 maiores concentrações na formulação

em pó pois a quantidade de DMF utilizada para diluir o medicamento seria superior a concentração considerada segura para não matar as bactérias (Figura 22).

Figura 23: Placa de 96 poços com Veículo nanoestruturado e DMF.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 3 a 11 aumenta a concentração dos medicamentos, sendo a coluna 2 poços sem ativos. As concentrações de Veículo nanoestruturado (Vn) são de 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 250; 500; e 1mg/mL. As concentrações de DMF são de 0,10; 0,25; 0,5; 1, e 2,5%

Um comportamento semelhante foi verificado na placa de veículo nanoestruturado e de DMF (Figura 23), porém o centro da placa ficou mais reduzido a olho nu do que os arredores.

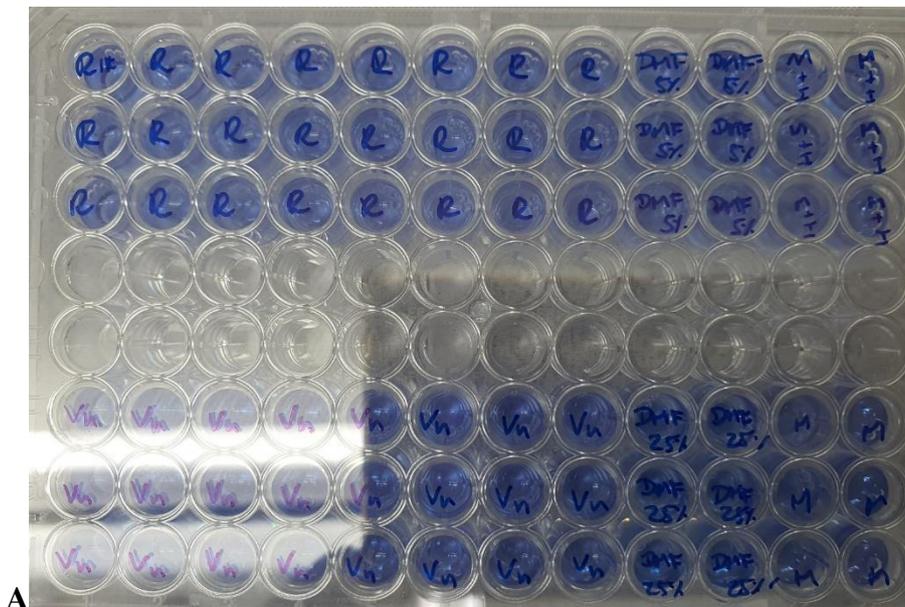
Nesta metodologia, a concentração de inóculo a ser colocado nos poços seria em torno de 3×10^8 ufc/mL, quantidade ajustada a partir da escala 1 McFarland, porém a forma de verificar essa

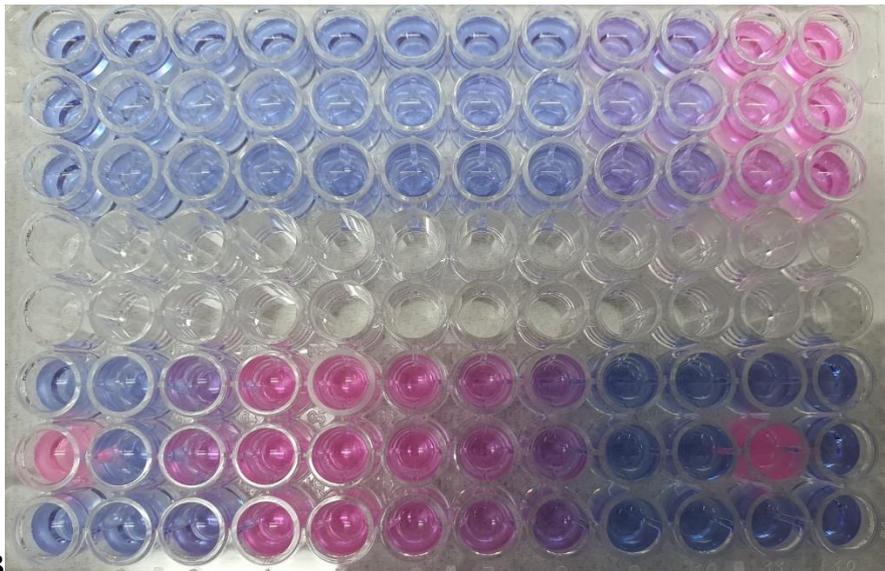
escala é a olho nú, por comparação do tubo do inóculo com um padrão 1 McFarland, o que pode ocorrer de não possuir realmente essa quantidade de inóculo (CINU *et al.*, 2019). Assim, foi mantida a hipótese de que a quantidade de bactéria por poço poderia ser diferente apesar de a mesma quantidade de inóculo ser adicionada na placa (100µL).

4.3.3 Teste 3

Para essa metodologia, o fabricante do meio de cultura MGIT considera para a quantidade de inóculo uma diluição de 1:5 da escala 0,5 McFarland, o que é em torno de 3×10^7 ufc/mL, uma quantidade 10 vezes menor do que a realizada nos testes anteriores. Os CIMs relatados em bula seriam de 0,2 µg/mL para a INH, 1 µg/mL para a RIF e 5 µg/mL para o EMB (DICKINSON, 2010).

Figura 24: Placa de 96 poços com rifampicina e veículo nanoestruturado.





B

Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 1 a 8 diminui a concentração dos medicamentos. Foi realizada uma diluição seriada, sendo as concentrações de rifampicina (R) de 4 a 0,03125 $\mu\text{g/mL}$ e de veículo nanoestruturado de 50 a 0,390625 $\mu\text{g/mL}$. DMF a 5% e MGIT+inóculo (M+I) são controles positivos. DMF 25% e MGIT(M) são controles negativos.

Nas duas primeiras colunas, o veículo nanoestruturado demonstrou matar a bactéria, começando a ter um crescimento bacteriano a partir da terceira coluna (12,5 $\mu\text{g/mL}$) (Gráfico 1). A oitava coluna de Vn ficou mais azulada em uma concentração baixa de fármaco, acredita-se que esse poço possa ter sido influenciado pelo posterior, que possui DMF a 25%, uma concentração que mata a bactéria. Apesar da modificação na metodologia de diluição do inóculo, a RIF manteve o mesmo comportamento, inibindo o crescimento bacteriano em todas as concentrações (Figura 24) (Gráfico 2).

Gráfico 1: Curva de crescimento bacteriano na presença de Coenzima Q₁₀ nanoestruturada, Coenzima Q₁₀ pó e Veículo nanoestruturado.

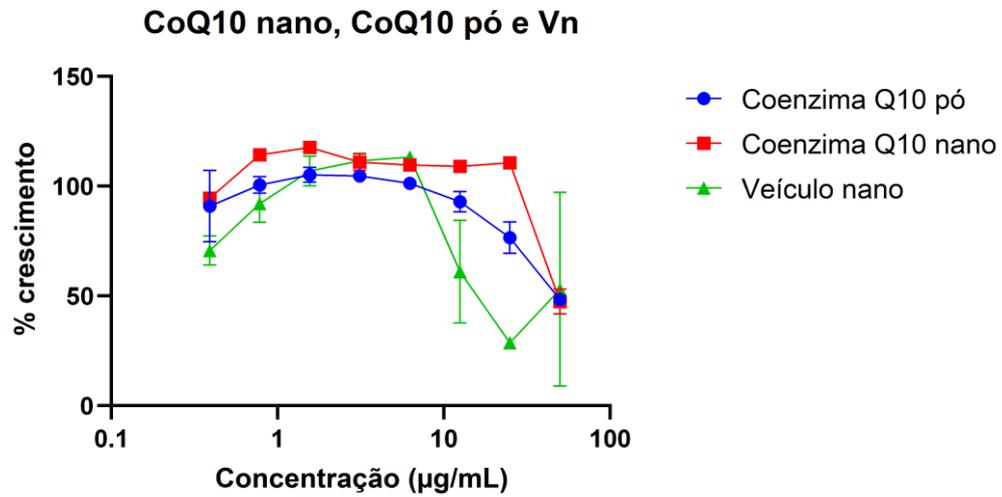


Gráfico 2: Curva de crescimento bacteriano nos testes de Rifampicina e Isoniazida.

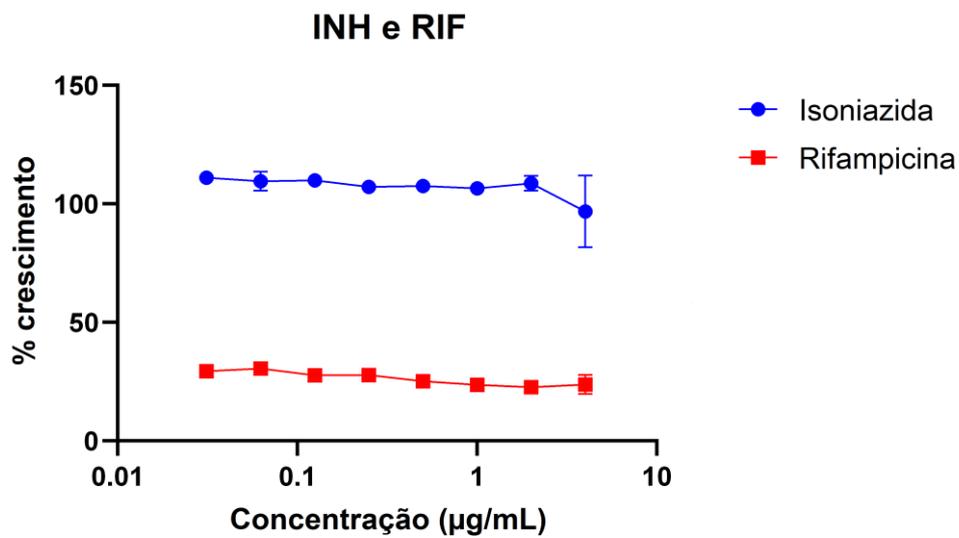
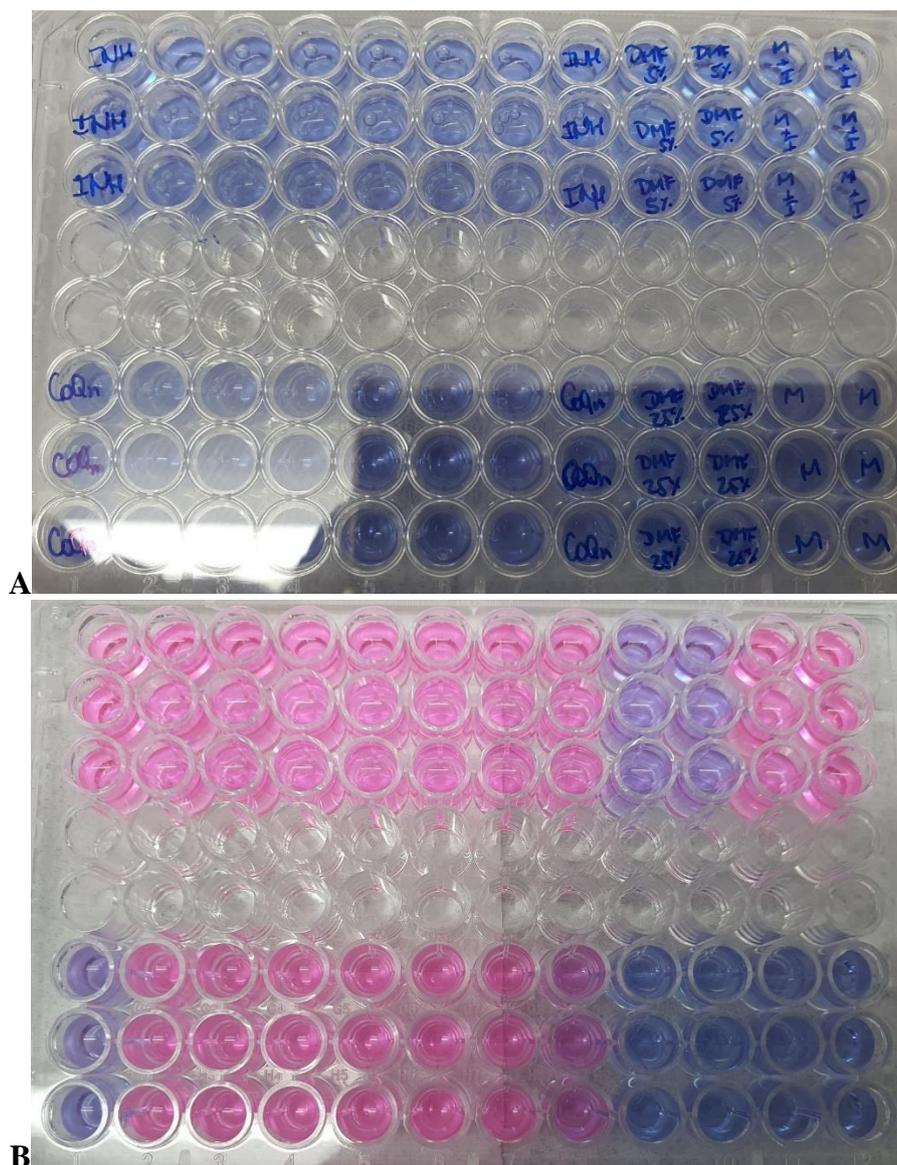


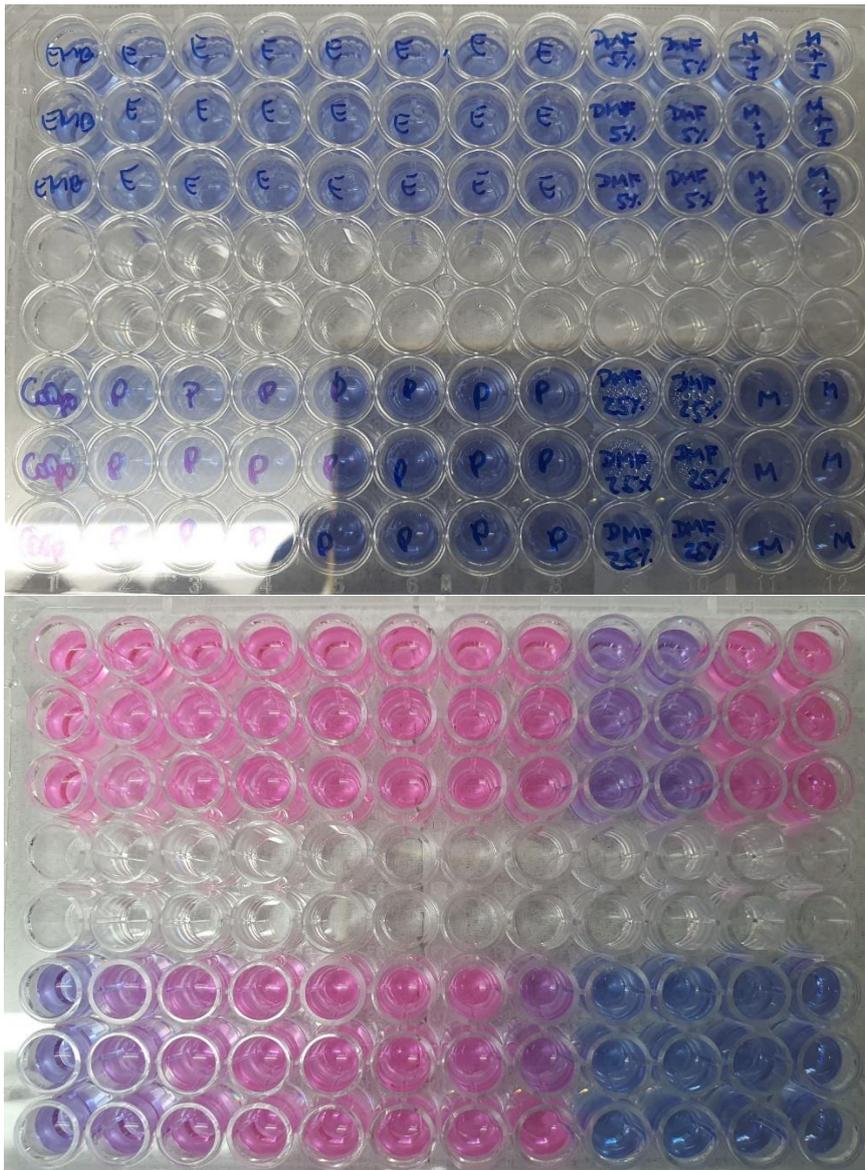
Figura 25: Placa de 96 poços com isoniazida e Coenzima Q₁₀ nanoestruturada.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 1 a 8 diminui a concentração dos medicamentos. Foi realizada uma diluição seriada, sendo as concentrações de isoniazida (INH) de 4 a 0,03125 µg/mL e de Coenzima Q₁₀ nanoestruturada de 50 a 0,390625 µg/mL. DMF a 5% e MGIT+inóculo (M+I) são controles positivos. DMF 25% e MGIT(M) são controles negativos.

Neste teste, ainda não foi possível encontrar o CIM da INH, mantendo o mesmo resultado dos testes anteriores (Figura 26) de em todas as concentrações não haver uma inibição do crescimento bacteriano. Já a CoQ₁₀ nanoestruturada demonstrou uma inibição na primeira coluna (50 µg/mL), podendo ser correlacionado ao resultado adquirido na placa de Vn e na placa de CoQ₁₀ pó (Gráfico 1).

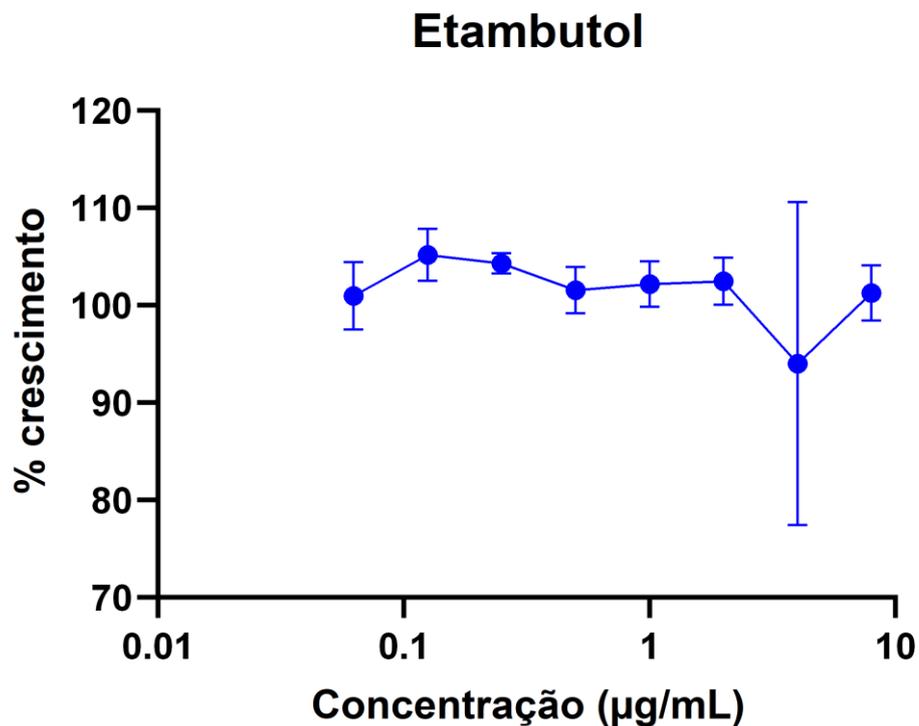
Figura 26: Placa de 96 poços com etambutol e Coenzima Q₁₀ em pó.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 1 a 8 diminui a concentração dos medicamentos. Foi realizada uma diluição seriada, sendo as concentrações de etambutol (E) de 8 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ e de Coenzima Q₁₀ em pó de 50 a 0,390625 $\mu\text{g/mL}$. DMF a 5% e MGIT+inóculo (M+I) são controles positivos. DMF 25% e MGIT(M) são controles negativos.

O etambutol manteve o mesmo comportamento dos outros testes, havendo crescimento bacteriano em todas as concentrações (Figura 26).

Gráfico 3: Curva de crescimento bacteriano na presença de etambutol.



Essa metodologia normalmente é realizada por meio do sistema automatizado BACTEC[®] MGIT[®] nos próprios tubos de MGIT, porém o fabricante determina bem a diluição do inóculo para a realização do CIM, então foi adaptada essa diluição para a testagem em placa de 96 poços (GONÇALVES, 2014).

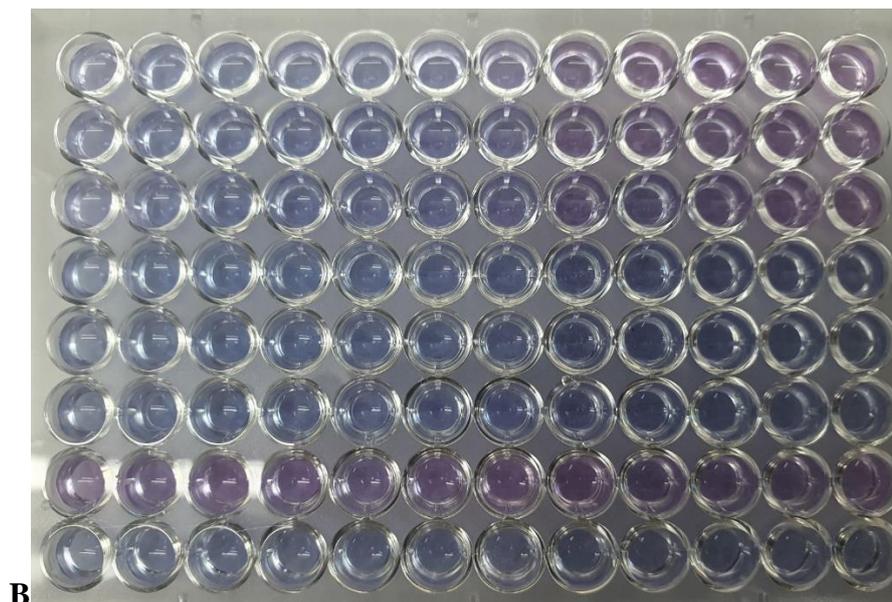
4.3.4 Teste 4

Uma nova modificação para a diluição do inóculo foi realizada. Empregou-se uma metodologia na qual é utilizado um espectrofotômetro a uma densidade óptica de 600nm para verificar de forma mais precisa a quantidade de bactéria presente no meio, sendo o inóculo desejado de 1×10^6 ufc/mL. O estudo que seguiu essa metodologia considerou um CIM de $0,10 \mu\text{M}$ para a INH e $1 \mu\text{M}$ para a RIF (REHBERG *et al.*, 2019).

Dessa forma, obteve-se um CIM50 na coluna 6, correspondente a $0,3125 \mu\text{M}$ (Gráfico 4). Já a rifampicina permaneceu inibindo o crescimento bacteriano em todas as concentrações, mantendo todos os poços em coloração azul (Figura 27).

Figura 27: Placa de 96 poços de fundo redondo com isoniazida e rifampicina.

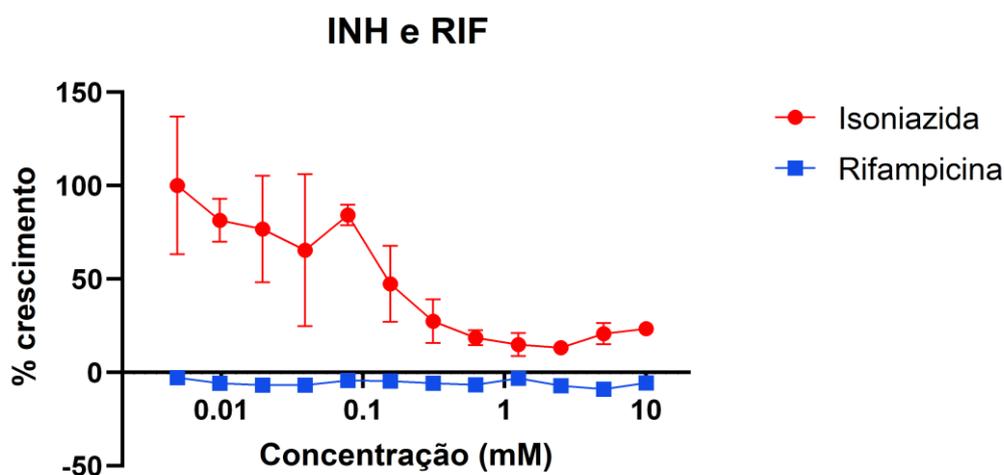




B

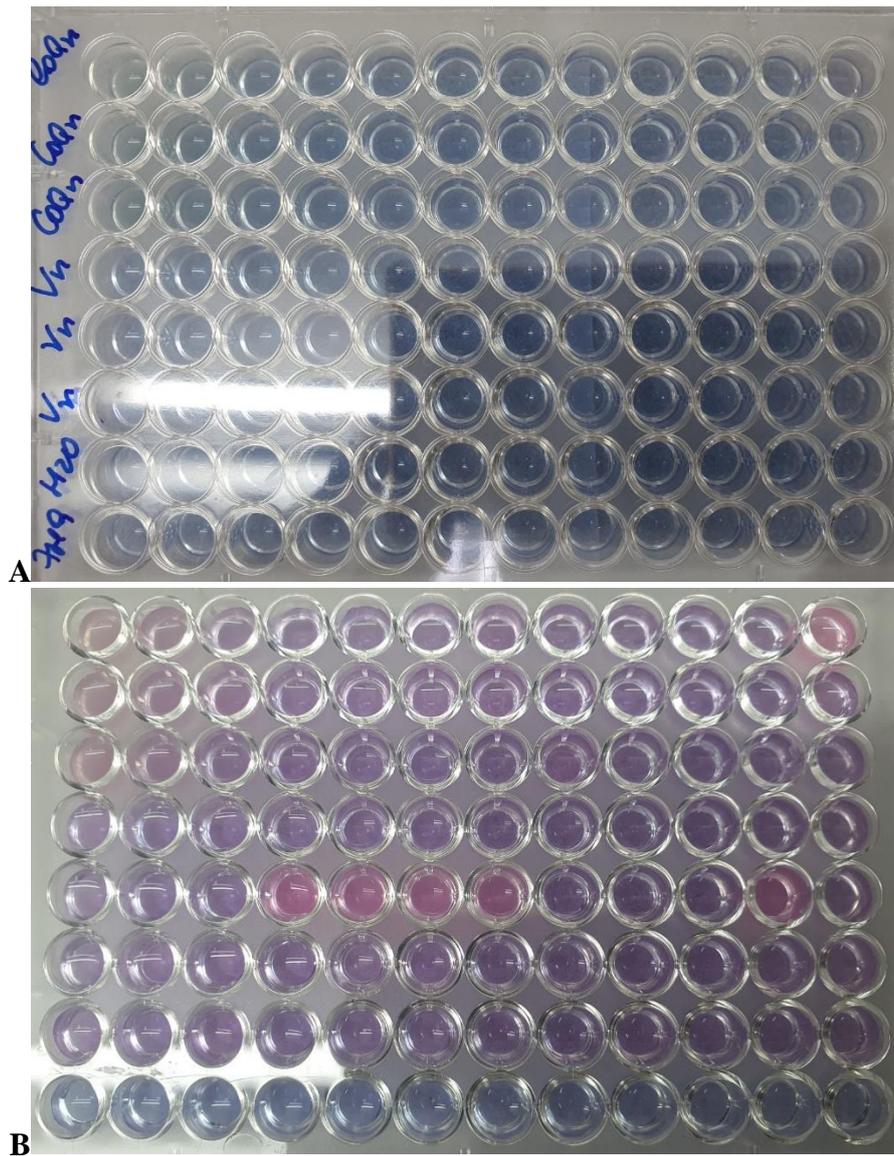
Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 1 a 12 diminui a concentração dos medicamentos. Foi realizada uma diluição seriada, sendo as concentrações de isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) de 10 a 0,0048 μM . DMSO (linha G) é o controle positivo. 7H9 (linha H) é o controle negativo.

Gráfico 4: Curva de crescimento bacteriano na presença de isoniazida e rifampicina.



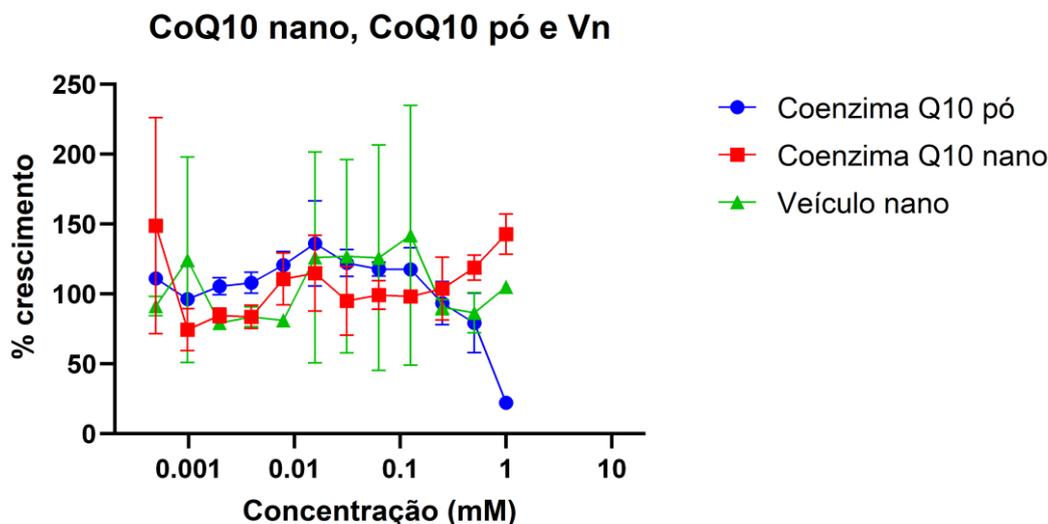
Comparando a Coenzima Q_{10} nanoestruturada, o Veículo nanoestruturado e a Coenzima Q_{10} pó, a partir da 3 coluna todos os medicamentos obtiveram um efeito parecido, porém, na primeira coluna, que corresponde a maior concentração das formulações, tanto o Vn quanto a CoQ_{10} nano demonstraram um maior crescimento bacteriano, enquanto a CoQ_{10} pó apresentou uma inibição bacteriana (Gráfico 5).

Figura 28: Placa de 96 poços de fundo redondo com Coenzima Q₁₀ nanoestruturada e seu veículo.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 1 a 12 diminui a concentração dos medicamentos. Foi realizada uma diluição seriada, sendo as concentrações de Coenzima Q₁₀ (CoQn) de 1 a 0,00048 mM e de veículo (Vn) proporcionais as do medicamento. H₂O (linha G) é o controle positivo. 7H9 (linha H) é o controle negativo.

Gráfico 5: Curva de crescimento bacteriano na presença Coenzima Q₁₀ nanoestruturada, Coenzima Q₁₀ pó e Veículo nanoestruturado.

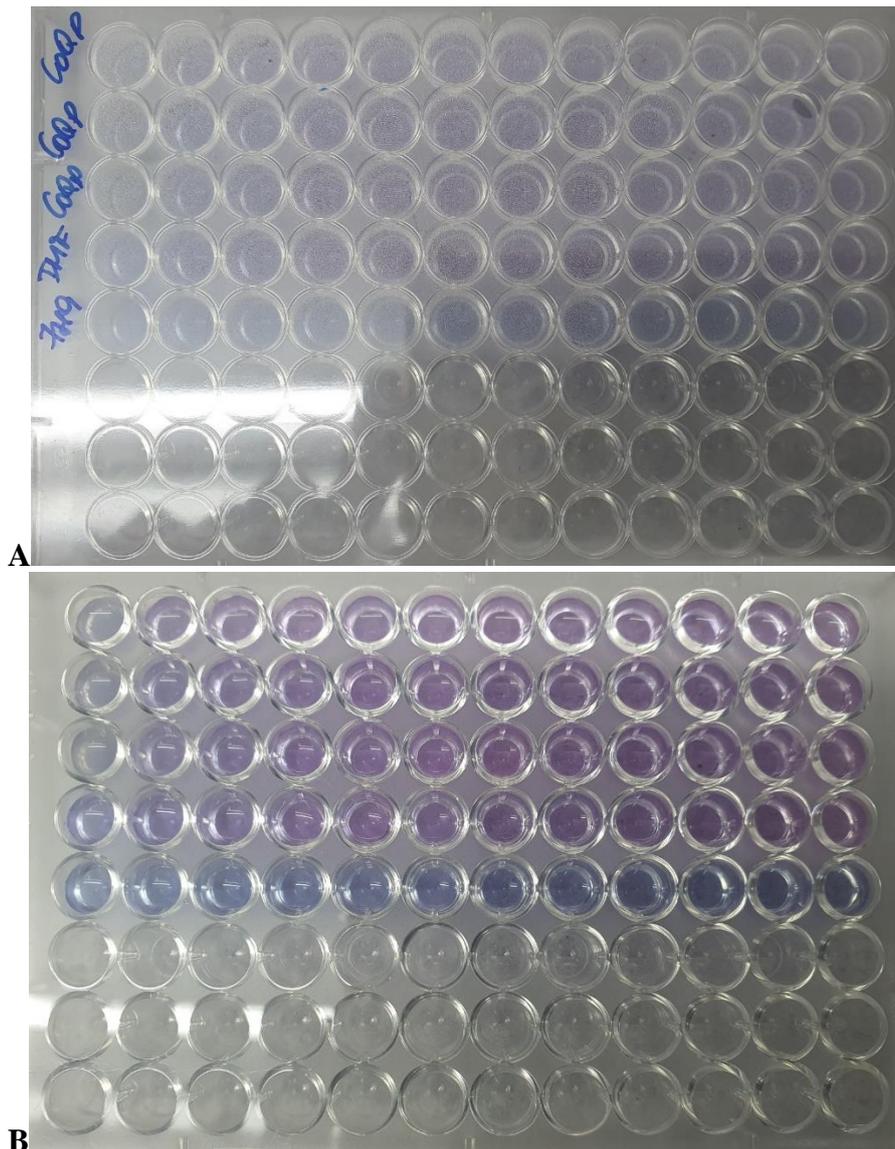


Como não houve uma quantidade maior de repetições dos testes, por causa da pandemia e porque o estudo em questão visou procurar uma melhor metodologia para a sua realização, e considerando a reduzida prática na área, por ser um assunto ainda novo para o grupo de pesquisa, os desvios padrões foram altos. Provavelmente, com uma maior quantidade de realizações do teste e uma maior prática na manipulação os testes tendam a diminuir o desvio padrão.

Comparando com as outras metodologias realizadas, essa foi a única que obteve um CIM de medicamento de primeira linha nas atuais condições do estudo. Ao longo da realização dos testes, a quantidade de inóculo a ser colocado na placa foi diminuindo, sendo o primeiro teste realizado com 3×10^8 ufc/mL e o último com 1×10^6 ufc/mL, um valor 300 vezes inferior.

O fato da rifampicina não ter obtido crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações pode se dar pelo fato de que, dentre os medicamentos de 1ª linha, ela é o fármaco com maior potência em sua ação esterilizante, sendo as outras drogas inseridas no tratamento principalmente para prevenir a resistência a rifampicina (DALCOMO, 2012). Também pode ser considerado que a bactéria utilizada nos testes foi a H37Ra, avirulenta, enquanto a maioria dos testes de CIM descritos em metodologia são com a H37Rv, virulenta. Porém, mais estudos são necessários para verificar essas hipóteses.

Figura 29: Placa de 96 poços de fundo redondo com Coenzima Q₁₀ em pó.



Legenda: **A:** Resazurina recém aplicada. **B:** resultado após 24 horas da aplicação da resazurina. Da coluna 1 a 12 diminui a concentração dos medicamentos. Foi realizada uma diluição seriada, sendo as concentrações de Coenzima Q₁₀ (CoQn) de 1 a 0,00048 mM. DMF (linha D) é o controle positivo. 7H9 (linha E) é o controle negativo.

5. CONCLUSÃO

Como foi apresentado, o crescimento da resistência aos medicamentos utilizados para o tratamento da tuberculose vem crescendo e a inovação na terapia da tuberculose é difícil de alcançar. Nos últimos anos, apenas dois novos medicamentos (bedaquilina e delamanid) foram aprovados para este uso, mas o antigo tratamento convencional ainda é o padrão ouro nesta terapia (D'AMBROSIO *et al.*, 2017). Sendo assim, neste trabalho foram utilizadas ferramentas computacionais e o reposicionamento de fármacos na tentativa de encontrar novas possibilidades de tratamento e de maneira mais rápida, eficaz e de menores custos que os métodos de pesquisa tradicionais.

O uso dos testes *in silico* para selecionar os componentes que foram utilizados na etapa posterior, a *in vitro*, ajudou significativamente na redução de custos, tempo investido com a etapa de triagem de medicamentos que seriam testados *in vitro* e também diminui os experimentos por tentativa e erro. Desses testes computacionais, foi possível selecionar que o fármaco mais promissor, dentre os existentes comercialmente, era a Coenzima Q₁₀.

Os testes *in vitro*, por sua vez, foram essenciais para poderem validar a Coenzima Q₁₀ como que existe uma interação com a bactéria da tuberculose. Embora os resultados dos experimentos não tenham levado a uma conclusão única sobre a interação existente entre a *Mycobacterium tuberculosis* e a Q₁₀, foi constatado em alguns a redução do crescimento da bactéria da tuberculose. Levanta-se a hipótese de que o veículo nanoestruturado pode ter influenciado o crescimento bacteriano. Dessa maneira, confirma-se a necessidade de que estudos sejam feitos para esclarecer a influência da Q₁₀ na tuberculose e a hipótese citada.

É importante destacar que não foram encontradas referências que abordassem qual seria a maneira mais adequada de realizar o teste *in vitro*. Nessas condições, optou-se por realizá-la de quatro maneiras distintas e dentre as metodologias utilizadas, a que apresentou resultados mais padronizados, mais confiáveis foi a metodologia a qual a quantidade de cepa é verificada por meio de absorvância, logo a do teste 4, permitindo com que se tenha maior controle em relação a quantidade de bactéria que está sendo colocada em cada poço. Portanto, sugere-se que estudos que se destinarem a dar continuidade a este, utilizem essa metodologia.

6. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M. J. *et al.* **Coenzyme Q biosynthesis in health and disease**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. v. 1857
- ANCY, I.; SIVANANDAM, M.; KUMARADHAS, P. Possibility of HIV-1 protease inhibitors-clinical trial drugs as repurposed drugs for SARS-CoV-2 main protease : a molecular docking , molecular dynamics and binding free energy simulation study. p. 1–8, 2020.
- ARENAS-JAL, M.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; GARCÍA-MONTOYA, E. Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 574–594, 2020.
- BAYNES, JOHN W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 3ª edição ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010.
- BD. BD BACTEC MGIT 960 SIRE Kit: Para o Teste da Sensibilidade Anti-micobacteriana do Mycobacterium tuberculosis. n. 04, p. 1–6, 2019.
- BONA, E. A. M. DE *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.
- BONAKDAR, R. A.; GUARNERI, E. Coenzyme Q10. **American Family Physician**, v. 72, n. 6, p. 1065–1070, 2005.
- BOSCO DE OLIVEIRA, H.; MARÍN-LEÓN, L.; CORRÊA CARDOSO, J. Differences in mortality profile of tuberculosis patients related to tuberculosis-Aids co-morbidity. **Revista de Saude Publica**, v. 38, n. 4, p. 503–510, 2004.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS ESTRATÉGICAS, B. **Manual de para o Controle da Tuberculose**. [s.l.: s.n.].
- BROWN, E. W. © 1962 Nature Publishing Group. **Nature International Journal of Science**, v. 196, p. 1048–1050, 1962.
- CAMPBELL, E. A. *et al.* Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. v. 104, p. 901–912, 2001.
- CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface**

Science, v. 107, n. 2–3, p. 125–155, 2004.

CHEVALIER, F. LE *et al.* Mycobacterium tuberculosis evolutionary pathogenesis and its putative impact on drug development. **Future Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 969–985, 2014.

CHO, S.; LEE, H. S.; FRANZBLAU, S. Chapter 17 Recovery Assay (LORA) for Mycobacterium tuberculosis. v. 1285, p. 281–292, 2015.

CHOLLET, A. *et al.* Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of Mycobacterium tuberculosis (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach. v. 190, p. 328–337, 2015.

CINU, T. A. *et al.* Design, synthesis and evaluation of antitubercular activity of Triclosan analogues. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 3316–3323, 2019.

COUTSIAS, E. A.; WESTER, M. J. RMSD and Symmetry. 2019.

D’AMBROSIO, L. *et al.* Delamanid and bedaquiline to treat multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in children: A systematic review. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, n. 7, p. 2093–2101, 2017.

DALCOMO, M. P. Tratamento da Tuberculose Sensível e Resistente. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 55–59, 2012.

DICKINSON, B. BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE kits for the antimycobacterial susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis. Package insert. **Growth (Lakeland)**, v. 8008200, n. 05, p. 1–18, 2010.

DIEDRICH, C. R.; O’HERN, J.; WILKINSON, R. J. HIV-1 and the Mycobacterium tuberculosis granuloma: A systematic review and meta-analysis. **Tuberculosis**, v. 98, n. March, p. 62–76, 2016.

FAN, Y.; MARIOLI, M.; ZHANG, K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 192, p. 113642, 2021.

FRAGA, H. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3^a ed. Rio de Janeiro-RJ: [s.n.].

GAGNEUX, S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 202–213, 2018.

GARRIDO-MARAVAR, J. *et al.* Clinical applications of coenzyme Q10. **Frontiers in Bioscience**, v. 19, p. 619–633, 2014.

- GETAHUN, H. *et al.* Latent Mycobacterium tuberculosis Infection . **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 22, p. 2127–2135, 2015.
- GONÇALVES, A. D. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FÁRMACOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA LINHA DO Mycobacterium tuberculosis MULTIRRESISTENTE E MUTAÇÕES RELACIONADAS À DE MINAS GERAIS , BRASIL Universidade Federal de Minas Gerais Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medic. 2014.
- HIDAKA, T. *et al.* Safety assessment of coenzyme Q 10 (CoQ 10). v. 32, p. 199–208, 2008.
- JAIN, A. N. Bias, reporting, and sharing: Computational evaluations of docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 22, n. 3–4, p. 201–212, 2008.
- KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12^a ed. Rio de Janeiro - RJ: AMGH Editora Ltda., 2014.
- KILMER, P. D. Review Article: Review Article. **Journalism**, v. 11, n. 3, p. 369–373, 2010.
- KOCH, A.; MIZRAHI, V. Mycobacterium tuberculosis. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 555–556, 2018.
- KR, S. *et al.* Xpert ® MTB / RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. **Cochrane Datase of Systematic Reviews**, n. 1, 2013.
- KRISHNASAMY, S. K. *et al.* Design, Synthesis, and Characterization of Some Hybridized Pyrazolone Pharmacophore Analogs against Mycobacterium tuberculosis. **Archiv der Pharmazie**, v. 349, n. 5, p. 383–397, 2016.
- MAGANTI, L.; GRANDHI, P.; GHOSHAL, N. Integration of ligand and structure based approaches for identification of novel MbtI inhibitors in Mycobacterium tuberculosis and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2016.
- MEHRABANI, S.; ARAB, A. Effect of Coenzyme Q10 Supplementation on Fatigue: A systematic review of interventional studies. 2019.
- MERK, A. *et al.* Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1698–1707, 2016.
- MODA, T. L. Modelagem In Silico de Propriedades Farmacocinéticas Para a Avaliação de Candidatos a Novos Fármacos. 2011.

MS/BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para diagnóstico laboratorial em saúde pública.** [s.l.: s.n.].

NIEMI, M. *et al.* Pharmacokinetic interactions with rifampicin: Clinical relevance. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 9, p. 819–850, 2003.

NOSENGO, N. New tricks for old drugs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 68, 2016.

ONDARROA, M.; SHARMA, S. K.; QUINN, P. J. Solvation Properties of Ubiquinone-10 in Solvents of Different Polarity. v. 6, n. 9, 1986.

ONLINE, V. A. *et al.* Access channel residues Ser315 and Asp137 in Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (KatG) control peroxidatic activation of the pro -drug isoniazid †. p. 11650–11652, 2013.

PELOQUIN, C. A.; DAVIES, G. R. The Treatment of Tuberculosis. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 110, n. 6, p. 1455–1466, 2021.

PHARMACIE, M. DE *et al.* Case series. v. 8688, p. 1–10, 2016.

PRÄBST, K.; ENGELHARDT, H.; RINGGELER, S. Chapter 1. v. 1601, p. 1–17, 2017.

PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Publishing Group**, 2018.

QU, H. *et al.* Effects of Coenzyme Q10 on Statin-Induced Myopathy: An Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. v. 10, p. 1–11, 2018.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. **Tubercle and Lung Disease**, v. 79, n. 1, p. 3–29, 1998.

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. p. 12347–12360, 2012.

REHBERG, N. *et al.* Supplementary Information 3- O -Methyl-alkylgallates inhibit fatty acid desaturation in Mycobacterium Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology , Heinrich Heine University Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry , Heinrich Heine Un. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2019a.

REHBERG, N. *et al.* 3-O-Methyl-alkylgallates inhibit fatty acid desaturation in Mycobacterium tuberculosis. v. 63, n. 9, p. 1–13, 2019b.

S. CAMPOS, H. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29–35,

2006.

SABJAN, K. B. *et al.* Nanoemulsion as Oral Drug Delivery - A Review. **Current Drug Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 4–15, 2019.

SCIOLI MONTOTO, S.; MURACA, G.; RUIZ, M. E. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. October, p. 1–24, 2020.

SEUNG, K. J.; KESHAVJEE, S.; RICH, M. L. Drug-Resistant Tuberculosis. p. 1–20, 2015.

SHECHTER, S. *et al.* Novel inhibitors targeting Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein identified using In Silico Structure-Based-Drug- Design. n. November, p. 1–16, 2017.

SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L. M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Respiratory Research**, v. 2, n. 3, p. 164–168, 2001.

TAYLOR, B. A. Does Coenzyme Q10 Supplementation Mitigate Statin-Associated Muscle Symptoms ? Pharmacological and Methodological Considerations. 2017.

TIMO, G. O. *et al.* Predictive power of in silico approach to evaluate chemicals against *m. tuberculosis*: A systematic review. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2021**. 1^a ed. Geneva: [s.n.].

ANEXO 1

Composto

15-deoxyspergualin	Adelmidrol	Amezinium
17-hydroxyprogesterone	Ademetionine	Amfepramone
1-deoxygalactonojirimycin	Adenosine	Amifampridina
3-angeloylingenol	Adrenalina	Amifostine
4-aminopyridine	Afatinib	Amikacin
4-Aminosalicylic acid	Afobazole	Amiloride
4-hydroxyandrostenedione	Agomelatine	Aminaftone
7-keto dhea	Alacepril	Amineptine
9-cis-Retinoic acid	Alatrofloxacin	Aminobenzoate
Abacavir	Albendazole	Aminocaproic acid
Abemaciclib	Alcaftadine	Aminolevulinic acid
Abiraterone	Alclometasone	Aminophylline
Acalabrutinib	Alectinib	Aminosidine
Acamprosate	Alendronato	Amiodarone
Acarbose	Alfacalcidol	Amisulpride
Acebutolol	Alfatradiol	Amitriptyline
Aceclofenac	Alfentanil	Amlexanox
Acemetacin	Alfuzosina	Amlodipine
Acenocoumarol	Alginate	Amobarbital
Acetaminophen	Alimemazine	Amorolfine
Acetazolamide	Alizapride	Amosulalol
Acetohexamide	Allisartan	Amoxapine
Acetorphan	Allopregnalone	Amoxicillin
Acetylcysteine	Allopurinol	Amphetamine
Acetylsalicylic acid	Almitrine	Amphotericin
Acexamate	Almotriptan	Amprenavir
Ácido azelaico	Alogliptin	Amrinone
Ácido quenodeoxicólico	Alosetron	Amrubicin
Ácido zoledrônico	Alpelisib	Amtolmetin guacil
Acipimox	Alpha-ergocryptine	Anagliptin
Acitazanolast	Alprazolam	Anagrelida
Acitretin	Alprenolol	Anastrozol
Aclatonium	Alprostadiil	Anatabine
Aclidinium	Altretamine	Androstanazole
Acotiamide	Alvimopan	Androstanolone
Acrivastine	Amadacycline	Anecortave
Actarit	Ambrisentan	Anethole
Actinospectacin	Ambroxol	Aniracetam

Acyclovir	Amcinonide	Anisotropine
Adamantamine	Amdinocillin	Anlotinib
Adapalene	Amdinocillin pivoxil	Ansamycin
Adefovir dipivoxil	Amenamevir	Antofloxacin
Apalutamide	Azilsartan	Berberine
Apatinib	Azithromycin	Besifloxacin
Apixaban	Azodisal	Besifovir
Aplonidine	Azodyne	Beta-Elemene
Apomorphine	Azosemide	Betahistine
Apremilast	Aztreonam L-lysine	Betaine
Aprepitant	Aztreonam	Betamethasone
Aprindine	Azuletil	Betaxolol
Aranidipine	Azurene	Bethanechol
Arbekacin	Baclofeno	Betrixaban
Arbutamine	Baloxavir	Bevantol
Arformoterol	Balsalazide	Bexarotene
Argatrobana	Bambuterol	Bezafibrate
Arglabin	Baricitinib	Biapenem
Aripiprazol	Barnidipina	Bicalutamida
Armodafinil	Barosmin	Bicyclol
Arotinolol	Bazedoxifene	Bifendate
Artemether	Beclometasone	Bifonazole
Artemotil	Bedaquiline	Bilastine
Artenimol	Befunolol	Bimatoprost
Artesunate	Belinostat	Binifibrate
Articaine	Belotecan	Binimetinib
Asenapina	Benazepril	Biocefalin
Astaxanthin	Bendamustine	Biperiden
Asunaprevir	Bendrofluazide	Bisacodyl
Ataluren	Benflumetol	Bisantrene
Atazanavir	Benfotiamine	Bisoprolol
Atenolol	Benidipina	Bitolterol
Atomoxetine	Benperidol	Bixalomer
Atovaquone	Bentazepam	Blonanserin
Atropine	Benvitimod	Boceprevir
Auranofin	Benzathine benzylpenicillin	Boforsin
Avanafil	Benzatropine	Bopindolol
Avatrombopag	Benzbromarone	Bortezomib
Axitinib	Benzethonium	Bosentan
Azacitidina	Benzfetamine	Bosutinib
Azacort	Benzhexol	Brexiprazole

Azaperone	Benznidazole	Brigatinib
Azasetron	Benzoate	Brimonidina
Azatadine	Benzocaine	Brinzolamide
Azathioprine	Benzydamine	Brivaracetam
Azd5847	Bepotastine	Brivudine
Azelastina	Bepridil	Brolitene
Azelnidipine	Beraprost	Bromazepam
Bromfenac	Cantricin	Cefoperazone
Bromhexine	Capecitabine	Ceforanide
Bromocriptine	Capreomycin	Cefoselis
Bromopride	Caprylic triglyceride	Cefotetan
Brotizolam	Capsaicina	Cefotiam
Brovincamine	Captopril	Cefotiam cilexetil
Broxaterol	Carbamazepina	Cefovecin
Bucillamine	Carbazochrome	Cefoxitin
Bucladesine	Carbenoxolone	Cefozopran
Budesonida	Carbetocin	Cefpirome
Budipine	Carbidopa	Cefpodoxime
Bufexamac	Carbimazole	Cefpodoxime proxetil
Buflomedil	Carbinoxamine	Cefprozil
Bulaquine	Carbocisteine	Cefroxadine
Bumetanide	Carboprost	Cefsulodin
Bunazosin	Carfentanil	Ceftaroline
Bupivacaine	Carfilzomib	Ceftazidime
Buprenorfina	Carglumic acid	Cefteram
Bupropiona	Cariprazine	Cefteram pivoxil
Buspirona	Carisoprodol	Ceftibuten
Busulfan	Carmustina	Ceftizoxime
Butamben	Caroverine	Ceftobiprole
Butamirate	Carpipramine	Ceftriaxone
Butenafine	Carteolol	Cefuroxime
Butoconazole	Carumonam	Cefuroxime axetil
Butorphanol	Carvedilol	Celecoxibe
Butriptyline	Cefaclor	Celiprolol
Cabazitaxel	Cefadroxil	Cenobamate
Cabergoline	Cefalexin	Ceritinib
Cabozantinib	Cefalotin	Cetlistat
Cadralazine	Cefamandole	Cetirizine
Caffeine	Cefazolin	Cetoconazol
Calciol	Cefcamate	Cetraxate
Calcipotriene	Cefcamate pivoxil	Cevimelina

Calcitriol	Cefdinir	Chidamide
Camostat	Cefditoren	Chlorambucil
Canabidiol	Cefditoren pivoxil	Chloramphenicol
Canagliflozin	Cefepime	Chlordiazepoxide
Canamycin	Cefetamet	Chlorhexidine
Candesartan	Cefetamet pivoxil	Chlorimipramine
Candesartan cilexetil	Cefiderocol	Chlormadinone
Cangrelor	Cefixime	Chlormethiazole
Canrenoate	Cefmenoxime	Chloroquine
Cantharidin	Cefmetazole	Chlorothiazide
Chlorphenamine	Clocortolone	Cyclovalone
Chlorphenesin	Clodronate	Cyproheptadine
Chlorpromazine	Clofarabina	Cyproterone
Chlorprothixene	Clofazimine	Cysteamine
Chlortalidone	Clofibrate	Cytisine
Chlortenoxicam	Clomiphene	Dabigatran
Cholic acid	Clonazepam	Dabrafenib
Choline	Clonidine	Dacarbazine
Chromium	Clopamide	Daclatasvir
Cibenzoline	Cloperastine	Dacomitinib
Ciclesonida	Clopidogrel	Danazol
Cicletanine	Cloprednol	Danoprevir
Ciclopirox	Clorazepate	Dantrolene
Cidofovir	Clospipramine	Dapagliflozin
Cilazapril	Clotiazepam	Dapiprazole
Cilnidipine	Clotrimazole	Dapoxetina
Cilostazol	Cloxacillin	Dapsone
Cimadronate	Clozapine	Darifenacina
Cimetidine	Cobicistat	Darolutamide
Cimetropium	Cobimetinib	Darunavir
Cinacalcet	Codeine	Dasabuvir
Cinitapride	Coenzyme Q ₁₀	Dasatinib
Cinnarizine	Colchicina	Decitabine
Cinolazepam	Colestilan	Deferasirox
Cinoxacin	Colforsin	Deferiprone
Ciprofibrate	Colforsin daproate	Deferoxamine
Ciprofloxacino	Colfosceril palmitate	Dehydroepiandrosterone
Cisapride	Conivaptan	Delafloxacin
Citalopram	Copanlisib	Delamanid
Citicoline	Covidarabine	Delapril
Citric acid	Creatine	Delavirdine

Cladribina	Cridanimod	Delmopinol
Clarithromycin	Crisaborole	Denopamine
Clemastine	Crizotinib	Deoxycholate
Clenbuterol	Cromoglycate	Deplin
Clevidipine	Cyamemazine	Depomedroxiprogesterona
Clevudine	Cyclandelate	Derisomaltose
Climbazole	Cyclidrol	Desflurane
Clindamicina	Cyclizine	Desipramine
Clinofibrate	Cyclobenzaprine	Desloratadina
Clioquinol	Cyclopentiazide	Desogestrel
Clobazam	Cyclophosphamide	Desonide
Clobetasol	Cycloserine	Desvenlafaxine
Cloconazole	Cyclothiazide	Deutetrabenazine
Dexamethasone	Dipyrrone	Dydrogesterone
Dexchlorpheniramine	Diquafosol	Ebastine
Dexibuprofen	Dirithromycin	Eberconazole
Dexketoprofen	Diroximel	Ec23
Dexlansoprazole	Disopyramide	Ecabet
Dexmedetomidina	Distigmine	Ecamsule
Dexmethylphenidate	Disulfiram	Echothiophate
Dexrazoxane	Dithiosteine	Econazole
Dextromethorphan	Divalproex	Ectoin
Dextromoramide	DI-thiaproline	Edaravone
Diacerein	Dobutamine	Edoxaban
Dianhydrogalactitol	Docarpamine	Efavirenz
Diazepam	Docetaxel	Efinaconazole
Diazoxide	Docosanol	Eflornitina
Dicarbamin	Dofetilide	Efonidipine
Dichlorophenamide	Dolasetron	Elagolix
Diclofenac	Dolutegravir	Elbasvir
Diclondazolic acid	Domperidone	Eldecalcitol
Dicloxacillin	Donepezila	Eletriptan
Dicyclomine	Dopexamine	Eliglustat
Dicycloplatin	Doravirine	Elliptinium
Didanosina	Doripenem	Elobixibat
Dienogeste	Dorzolamide	Elsulfavirine
Diethylcarbamazina	Dosulepin	Eltrombopag
Difenoxin	Doxapram	Eluxadolina
Diflorasone	Doxazosin	Elvitegravir
Diflunisal	Doxepin	Emedastina

Difluprednate	Doxercalciferol	Emonapride
Digoxina	Doxifluridine	Emoxypine
Dihydrocodeine	Doxofylline	Empagliflozin
Dihydroergotamine	Doxorrubicina	Emtricitabine
Diltiazem	Doxycycline	Enalapril
Dimebolin	Doxylamine	Enasidenib
Dimemorfan	Dronabinol	Encorafenib
Dimenhydrinate	Dronedarone	Enoloxone
Dimercaprol	Droperidol	Enoximone
Dimethylfumarate	Drospirenone	Entacapona
Dinalbuphine	Drotaverine	Entecavir
Dinoprostone	Droxidopa	Entrectinib
Diphenhydramine	Dtpa	Enzalutamide
Diphenidol	Duloxetina	Epalrestat
Dipivefrine	Dutasteride	Eperisone
Dipyridamole	Duvelisib	Epinastina
Eplerenone	Etonogestrel	Flomoxef
Epoprostenol	Etoposide	Florbetaben
Eprosartan	Etoricoxibe	Floxacillin
Eptazocine	Etozolin	Floxuridine
Eptifibatide	Etravirine	Flubendazole
Eravacycline	Everolimus	Fluciclovine
Erdafitinib	Evocalcet	Fluconazol
Ergothioneine	Evogliptin	Flucytosine
Eribulin	Exalamide	Fludarabina
Erlosamide	Exemestano	Fludeoxiglucose
Erlotinib	Ezetimibe	Fludrocortisone
Ertapenem sodium	Ezogabine	Fluindostatin
Ertugliflozin	Fadrozole	Flumatinib
Erythromycin	Falecalcitriol	Flumazenil
Esaxerenone	Famciclovir	Flunarizine
Eserine	Famotidine	Flunisolide
Esflurbiprofen	Faropenem	Fluocinolona
Esketamine	Fasudil	Fluocinonide
Eslicarbazepine	Favipiravir	Fluocortin
Esmolol	Fazadinium	Fluorescein
Esomeprazole	Febuxostat	Fluorometholone
Estavadina	Fedratinib	Fluorouracil
Estazolam	Felbamate	Fluoxetine
Estiripentol	Felbinac	Flupenthixol

Estradiol	Felodipine	Fluphenazine
Estramustine	Fenbufen	Flurazepam
Estramustine phosphate	Fenilefrina	Flurbiprofen
Estriol	Fenofibrato	Fluridil
Etacrynic acid	Fenoldopam	Fluspirilene
Etaquine	Fenoprofen	Flutamide
Ethambutol	Fenoterol	Flutemetamol
Ethchlorvynol	Fentanil	Fluticasona
Ethinyl estradiol	Fenticonazole	Flutrimazole
Ethionamide	Fentolamina	Flutropium
Ethosuximide	Fesoterodine	Fluvoxamina
Ethotoin	Fexnidazole	Fomepizol
Ethyl loflazepate	Fexofenadine	Fonturacetam
Etidronate	Fimasartan	Formoterol
Etiracetam	Finafloxacin	Forodesine
Etizolam	Finasteride	Fosamprenavir
Etodolac	Fingolimod	Foscarnet
Etofibrate	Flavoxate	Fosfluconazole
Etofilline	Flecainide	Fosfomicin
Etomidate	Flibanserin	Fosfosal
Fosinopril	Glycerol phenylbutyrate	Idoxuridine
Fosphenytoin	Glycididazole	Ifenprodil
Fospropofol	Golotimod	Ifosfamida
Fosravuconazole	Gosogliptin	Iguratimod
Fotemustine	Granisetrona	Ilaprazole
Frademicina	Grazoprevir	Iloperidone
Franidipine	Griseofulvin	Iloprost
Frovatriptan	Guaiazulenesulfonate	Imatinibe
Fruquintinib	Guanadrel	Imidafenacin
Fudosteine	Guanethidine	Imidapril
Fulvestrant	Guanfacina	Imipramine
Fumagillin	Halazepam	Imiquimod
Furosemide	Halobetasol	Indacaterol
Fusidate	Halofantrine	Indapamide
Fusidic acid	Halometasone	Indeloxazine
Gabapentin	Haloperidol	Indenolol
Gabexate	Halopredone	Indinavir
Gadobutrol	Hematoporphyrin	Indisetrone
Gadodiamide	Hexametazime	Indocyanine green
Gadofosveset	Hexaminolevulinate	Indometacin
Gadopentetate	Hexoprenaline	Indoramin
Gadoterate	Hidrocortisona	Iobenguane
Gadoversetamide	Hidroxiureia	Iodofiltic acid

Gadoxate	Hioscina	Iodoquinol
Galantamine	Histamine	Ioflupane
Gallopamil	Homatropine	Iomazenil
Gamolenic acid	Homoharringtonine	Iomeprol
Ganciclovir	Hyaluronate	Iopamidol
Garenoxacin	Hydralazine	Iopromide
Gatifloxacin	Hydrochlorothiazide	Ioversol
Gefitinibe	Hydrocodone	Ipragliflozin
Gemfibrozil	Hydrocortisone	Ipratropium
Gemifloxacin	Hydroflumethiazide	Ipriflavone
Gemigliptin	Hydromorphone	Irbesartan
Gencitabina	Hydroxychloroquine	Irinotecan
Gestrinone	Hydroxyzine	Irsogladine
Gilteritinib	Hyoscine	Isavuconazonium
Glasdegib	Ibandronate	Isepamicin
Glibenclamida	Ibopamine	Isocarboxazid
Glibornuride	Ibrutinib	Isoconazole
Gliclazide	Ibudilast	Isoglycyrrhizinate
Glicopirrolato	Ibuprofen piconol	Isoniazid
Glimepiride	Ibuprofeno	Isosorbide 5-mononitrate
Glipizide	Ibutilide	Isosorbide dinitrate
Gliquidone	Icosapent	Isotretinoin
Glucosamine	Icotinib	Isradipine
Glufanide	Idarubicin	Istradefylline
Glutamine	Idebenona	Itavastatin
Glutathione	Idelalisib	Itopride
Itraconazole	Levobunolol	Loxoprofen
Ivabradine	Levobupivacaine	L-selenomethionine
Ivacaftor	Levocabastine	Temoporfin
Ivosidenib	Levocarnitine	Tetrofosmin
Ixabepilone	Levocetirizine	Thimerosal
Ixazomib	Levodopa	Tiropamide
Josamycin	Levofloxacin	Tocofersolan
Kanamycin	Levofolate	Tocoretinate
Ketamine	Levomenthol	Trabectedine
Ketanserin	Levomepromazine	Udenafil
Ketazolam	Levonorgestrel	Valrubicin
Ketoprofen	Levorphanol	Vaniprevir
Ketorolac	Levosimendan	Venetoclax
Ketotifen	Levosulpiride	Vincristine
Kinetin	Levothyroxine	Vindesine
Labetalol	Lexidronam	Vinflunine
Lacidipine	Lidocaina	Vinorelbine
Lactitol	Lidofenin	Vitamina B6
Lafutidine	Lifitegrast	Zotarolimus
Lamivudina	Limaprost	Nelarabine
Lamotrigina	Linagliptin	Nelfinavir

Landiolol	Linezolid	Nemonoxacin
Laninamivir	Linsidomine	Neostigmine
Lanoconazole	Liothyronine	Nepafenac
Lansoprazole	Lipoic acid	Nepinalone
Lapatinib	Liranaftate	Neratinib
Larotrectinib	Lisinopril	Neridronate
Lascufloxacin	Lisuride	Netarsudil
Lasmiditan	L-Lysine-d-amphetamine	Neticonazole
Lasofoxifene	Lobeglitazone	Nevirapina
Latamoxef	Lobenzarit	Niacina
Latanoprost	Lofepamine	Niacinamide
Latanoprostene	Lofexidine	Nicardipine
Lauromacrogol	Lomefloxacin	Nicavir
Lefamulin	Lomerizine	Nicergoline
Leflunomida	Lomitapide	Niclosamide
Lemborexant	Lomustine	Nicorandil
Lenalidomide	Loperamide	Nicotinamide riboside
Lenvatinib	Loprinone	Nicotine
Lercanidipina	Loracarbef	Nifedipine
Lesinurad	Loratadine	Nifekalant
Letermovir	Lorazepam	Nifurtimox
Letosteine	Lorcaserin	Nifurzide
Letrozol	Lorlatinib	Nilotinib
Leucovorin	Lormetazepam	Nilutamide
Levalbuterol	Losartan	Nilvadipine
Levamisole	Loteprednol	Nimesulide
Levamlodipine	Loteprednol etabonate	Nimodipine
Levdropropizine	Lovastatin	Nimorazole
Levobetaxolol	Loxapina	Nimustine
Nintedanib	Oxpentifylline	Phenytoin
Nipradilol	Oxprenolol	Phloroglucin
Niraparib	Oxybate	Phthalide
Nisoldipine	Oxymetazoline	Phylloquinone
Nitazoxanide	Oxymetholone	Piceid
Nitisinone	Oxymorphone	Picosulfate
Nitrendipine	Oxytetracycline	Pidolate
Nitrofurantoin	Ozagrel	Pifatidine
Nitroglicerina	Ozenoxacin	Piketoprofen
Nitroxazepine	Palbociclib	Pilocarpine
Nizatidine	Paliperidone	Pilsicainide
Nordazepam	Palonosetron	Pimobendan
Norethindrone	Pamidronate	Pimozide
Norfloxacin	Pancuronium	Pinacidil
Nortriptyline	Panobinostat	Pinaverium
O-Acetyl-L-carnitine	Pantoprazole	Pindolol
Obeticholic	Paracalcin	Pinitol
Obidoxime	Parecoxib	Pioglitazona

Octanoylsalicylic	Paroxetine	Pipamperone
Ofloxacin	Pazopanib	Piperacillin
Olanzapina	Pazufloxacin	Pipothiazine
Olaparib	Peficitinib	Piracetam
Olmesartan	Pefloxacin	Pirarubicin
Olmesartan medoxomil	Pemafibrate	Pirbuterol
Olmutinib	Pemetrexed	Pirenoxine
Olodaterol	Pemirolast	Pirenzepine
Olopatadina	Pemoline	Piretanide
Omarigliptin	Penbutolol	Pirfenidona
Omeprazole	Penciclovir	Piribedil
Omidenepag	Penfluridol	Piritramide
Omnipaque	Pentaerithryl tetranitrate	Pirmenol
Omoconazole	Pentamidine	Piroxicam
Ondansetrona	Pentazocine	Pirprofen
Opicapone	Peramivir	Pitavastatin
Opipramol	Perampanel	Pitolisant
Orilotimod	Pergolide	Pixantrone
Orphenadrine	Perhexiline	Pizotifen
Oseltamivir	Periciazine	Plaunotol
Osimertinib	Perindopril	Plazomicin
Ospemifene	Perospirone	Plerixafor
Oxamniquine	Perphenazine	Podofilox
Oxandrolone	Pexidartinib	Polaprezinc
Oxatomide	Phendimetrazine	Polmacoxib
Oxazepam	Phenelzine	Polyestradiol
Oxcarbazepina	Phenethicillin	Polystyrene
Oxibutinina	Phenobarbital	Polythiazide
Oxicodona	Phenoxybenzamine	Pomalidomide
Oxiconazole	Phenprocoumon	Ponatinib
Oxiracetam	Phentermine	Prajmalium
Oxitropium	Phenylbutyrate	Pralatrexate
Pralidoxime	Quinagolide	Roflumilast
Pramipexol	Quinalbarbitone	Rolapitant
Pramipide	Quinapril	Rolitettracycline
Pramiracetam	Quinethazone	Romidepsin
Pranlukast	Quinine	Ronifibrate
Prasugrel	Quizartinib	Ropinirol
Pravastatina	Rabeprazol	Ropivacaina
Prazepam	Radotinib	Rosiglitazone
Praziquantel	Raloxifeno	Rosoxacin
Prazosin	Raltegravir	Rotigotina
Prednicarbate	Raltitrexed	Roxadustat
Prednisolona	Ramatroban	Rucaparib camsylate
Prednisona	Ramelteon	Rufinamida
Pregabalin	Ramipril	Rupatadine
Pretomanid	Ramosetron	Ruxolitinib

Prilocaine	Ranelic acid	Safinamide
Primaquine	Ranitidine	Salazosulfapyridine
Primidone	Ranolazina	Salbutamol
Probenecid	Rasagiline	Salsalate
Probucol	Reboxetine	Sapropterin
Procainamide	Regadenoson	Sarecycline
Procatenol	Regorafenib	Saroglitazar
Prochlorperazine	Relugolix	Sarpogrelate
Procyclidine	Remifentanil	Saxagliptin
Progesterone	Remimazolam	Schizophyllan
Proglumide	Remogliflozin	Secnidazole
Promazine	Remoxipride	Selegiline
Promegestone	Repaglinide	Selexipag
Propacetamol	Retapamulin	Selinexor
Propafenone	Revaprazan	Seratrodast
Propantheline	Revefenacin	Sertaconazole
Propatyl	Ribavirin	Sertindol
Propiverine	Ribociclib	Sertraline
Propofol	Riboflavin	Setastine
Propranolol	Rifamycin	Setiptiline
Proscillaridin	Rilmazafone	Sevoflurane
Protionamide	Rilménidine	Sildenafil
Protirelin	Rilpivirine	Silibinin
Protriptyline	Riluzol	Silodosin
Prucalopride	Rimantadine	Simvastatin
Prulifloxacin	Rimexolone	Sitafloxacin
Pyrantel	Riociguat	Sitagliptin
Pyrazinamide	Ripasudil	Sitaxentan
Pyridostigmine	Risedronate	Sivelestat
Pyrimethamine	Risperidona	Sofalcone
Pyronaridine	Ritodrine	Sofosbuvir
Pyrophosphate	Rivaroxaban	Solifenacin
Pyrotinib	Rivastigmina	Solriamfetol
Quazepam	Rizatriptan	Sonidegib
Quetiapine	Rocuronium	Sorafenib
Sotagliflozin	Tegaserod	Mesalamine
Sotalol	Tegoprazan	Mesna
Sparfloxacin	Telbivudine	Metaraminol
S Piperone	Telmisartan	Metaxalone
Spirapril	Telotristat	Metergoline
Spirolactone	Temazepam	Metformin
Streptomycin	Temocapril	Methadone
Streptozocin	Temocillin	Methamphetamine
Sufentanil	Temozolomida	Methazolamide
Sulconazole	Teneligliptin	Methimazole
Sulfadiazine	Tenofovir	Methixene
Sulfafurazole	Tenoxicam	Methocarbamol

Sulfinpyrazone	Teprenone	Methohexital
Sulindac	Terazosin	Methoxamine
Sulpiride	Terbinafine	Methoxasalen
Sultopride	Terbutaline	Methsuximide
Sumatriptano	Masoprocol	Methyclothiazide
Sunitinib	Maxacalcitol	Methyl aminolevulinate
Suplatast	Mazindol	Methyl dopa
Suralgan	Mebendazole	Methylene blue
Sutezolid	Mebeverine	Methylergobasine
Suvorexant	Mecamylamine	Methylnaltrexone
Tacalcitol	Mechlorethamine	Methylphenidate
Tacrine	Meclizine	Methylprednisolone
Tadalafil	Meclocycline	Methyltestosterone
Tafamidis	Meclofenamate	Methysergide
Tafluprost	Medigoxin	Metipranolol
Talazoparib	Medronate	Metirosine
Talidomida	Mefenamic acid	Metoclopramide
Talinolol	Mefloquine	Metolazone
Talipexole	Megestrol	Metopimazine
Talniflumate	Meglumine	Metoprolol
Taltirelin	Melarsoprol	Metotrexato
Tamibarotene	Melatonina	Metoxiflurano
Tamoxifen	Meloxicam	Metrifonate
Tandospirone	Melperone	Metronidazol
Tansulosina	Melphalan	Metyrapone
Tapentadol	Memantina	Mexazolam
Tarenflurbil	Menaquinone-4	Mexiletina
Tasimelteon	Mepacrine	Mezlocillin
Taurine	Mepenzolate	Mianserin
Taurolidine	Meperidine	Micofenolato
Tauroursodeoxycholic acid	Mephénytoin	Miconazol
Tazarotene	Mephobarbital	Midalcipran
Tebipenem	Mepindolol	Midazolam
Tebipenem pivoxil	Mepivacaine	Midodrine
Technetium sestamibi	Meptazinol	Midoriamin
Tecovirimat	Mequitazine	Midostaurina
Tedisamila	Mercaptopurina	Mifepristona
Tedizolid	Meropenem	Miglitol
Miglustat	Naldemedine	Terconazole
Milnacipran	Nalfurafine	Terguride
Milrinone	Nalmefene	Teriflunomide
Miltefosine	Naloxegol	Terizidone
Minociclina	Naloxona	Tertatolol
Minodronate	Naltrexone	Testosterone
Minoxidil	Nandrolone	Tetrabenazine
Mirabegron	Naphazoline	Tetradecyl sulfate
Mirodenafil	Naphthoquine	Theophylline

Mirogabalin	Naproxen	Thiamphenicol
Mirtazapine	Naratriptan	Thiethylperazine
Misoprostol	Narcosine	Thioridazine
Mitiglinide	Narlaprevir	Thiotepa
Mitomycin	Natamycin	Thiothixene
Mitoquinone	Nateglinida	Tiagabine
Mitotane	Nebivolol	Tianeptine
Mitoxantrone	Nedocromil	Tiapride
Mizolastine	Nefazodone	Tibezonium
Mizoribine	Nefopam	Tibolone
Moclobemide	Octenidine	Ticagrelor
Modafinil	Olanedine	Ticlopidine
Moexipril	Orlistat	Tigecycline
Mofezolac	Otilonium	Tilidine
Molsidomine	Paclitaxel	Tilisolol
Mometasona	Padeliporfin	Tilorone
Monomethyl	Palmidrol	Tiludronate
Montelukast	Pantethine	Timolol
Morniflumate	Perclozone	Tinidazole
Morphine	Pimecrolimus	Tioconazole
Mosapride	Pirrolidone	Tioguanine
Motretinide	Posaconazole	Tiopronin
Moxidectina	Pralmorelin	Tiotropium
Moxifloxacin	Rapamycin	Tipranavir
Moxisylyte	Rifambutin	Tiratricol
Moxonidine	Rifampicin	Tirilazad
Mozavaptan	Rifapentin	Tirofiban
Mupirocin	Rifaximin	Tivozanib
Mycophenolate	Ritonavir	Tizanidine
Nabilone	Rokitamycin	Tobramicina
Nabumetone	Roxithromycin	Tocainide
N-acetylcarnosine	Salmeterol	Tocopherol
N-Acetyl-S-farnesyl-L- cysteine	Saquinavir	Tofacitinib
Nadifloxacin	Selanc	Tofisopam
Nadolol	Semax	Tofogliflozin
Nafamostat	Simeprevir	Tolazamide
Nafronyl	Tacrolimus	Tolbutamide
Naftazone	Talaporfin	Tolcapona
Naftifin	Tavaborole	Tolciclate
Naftopidil	Telaprevir	Tolfenamic acid
Nalbuphine	Telithromycin	Tolmetin
Tolnaftate	Troxipide	Zaleplon
Toloxatone	Tulobuterol	Zaltoprofen
Tolperisone	Ubenimex	Zanamivir
Tolterodina	Ubrogepant	Zanubrutinib
Tolvaptan	Ulipristal	Zidovudine
Topiramate	Umeclidinium	Zileuton

Topiroxostat	Unoprostone	Ziprasidone
Topotecan	Upadacitinib	Zofenopril
Torasemide	Urapidil	Zolmitriptan
Toremifeno	Uridine	Zolpidem
Tosufloxacin	Uridine triacetate	Zonisamida
Tramadol	Ursodeoxycholic acid	Zopiclone
Trametinib	Valaciclovir	Zotepine
Trandolapril	Valbenazine	Zucapsaicin
Tranexamic acid	Valganciclovir	
Tranilast	Valnemulin	
Tranylcypromine	Valproic acid	
Trapidil	Valpromide	
Travoprost	Valsartan	
Trazodona	Vandetanib	
Trelagliptin	Vardenafil	
Treosulfan	Varenicline	
Trepibutone	Vecuronium	
Treprostinila	Vedaprofen	
Tretinoin	Vemurafenib	
Tretoquinol	Venlafaxina	
Triamcinolone	Veralipride	
Triamterene	Verapamil	
Triazolam	Vernakalant	
Tribendimidine	Vibegron	
Trichlormethiazide	Vidarabine	
Triclabendazole	Vigabatrina	
Trientina	Vilazodone	
Trifarotene	Vildagliptina	
Trifluoperazine	Vinpocetine	
Trifluridine	Vismodegib	
Triflusal	Visomitin	
Trifosfamide	Voglibose	
Trimebutine	Vonoprazan	
Trimegestone	Vorapaxar	
Trimetazidine	Voriconazole	
Trimethoprim	Vorinostat	
Trimipramine	Voxelotor	
Tripolidine	Warfarin	
Tritocualina	Xamoterol	
Tromantadine	Xipamide	
Trometamol	Xylometazoline	
Tropisetron	Yohimbine	
Trospium	Zabofloxacin	
Trovafloracin	Zafirlukast	