



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VINICIUS DE MELO MILANI

**ESTUDOS *IN SILICO* DE TIUREIAS COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DA ENZIMA *MtbHadAB* E ENCAPSULAMENTO
COM LIPOSSOMAS**

Londrina
2024

VINICIUS DE MELO MILANI

**ESTUDOS *IN SILICO* DE TIOUREIAS COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DA ENZIMA HadAB E ENCAPSULAMENTO
COM LIPOSSOMAS**

Qualificação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr. Marcelle de Lima Ferreira Bispo;

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana.

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

V785e de Melo Milani, Vinicius.
Estudos in silico de tioureias como potenciais inibidores da enzima mtbhadab e encapsulamento com lipossomas / Vinicius de Melo Milani. - Londrina, 2024. 107 f. : il.

Orientador: Marcelle de Lima ferreira bispo.
Coorientador: Renato-márcio Ribeiro viana.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Química medicinal - Tese. 2. Docking molecular - Tese. 3. Tuberculose - Tese. 4. Cadd - Tese. I. de Lima ferreira bispo, Marcelle. II. Ribeiro viana, Renato-márcio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDU 54

VINICIUS DE MELO MILANI

**ESTUDOS IN SILICO DE TIOUREIAS COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DA ENZIMA MTBHADAB E ENCAPSULAMENTO COM
LIPOSSOMAS**

Dissertação apresentado à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Renato-Márcio Ribeiro Viana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
– UTFPR

Prof. Dra. Priscila Goes Camargo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
– UTFPR

Londrina, 26 de agosto de 2024.

RESUMO

MILANI, Vinicius de Melo Milani. **ESTUDO *IN SILICO* DE TIOUREIAS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA HADAB E ENCAPSULAMENTO COM LIPOSSOMAS**. 2023. 107 folhas. Monografia (Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que é uma grande preocupação global. Ocorrências de cepas resistentes deste agente infeccioso é um fator agravante, elevando assim a necessidade pela busca de novas alternativas de tratamento para esta doença que assola a humanidade há milênios. O Isoxil (**ISO**), também conhecido como Tioarlida, é um importante agente antimicobacteriano, da classe das tioureias, que foi utilizado para controle de casos de TB na década de 1960, porém, caiu em desuso devido a sua baixa biodisponibilidade oral. Mecanismos relatados em literatura associam sua atividade com a capacidade de inibir a (3R)-hidroxiacil-ACP-desidratase (HadAB), enzima esta que participa da biossíntese de ácidos micólicos, que compõem a estrutura da parede celular da micobactéria. Os estudos computacionais de triagem virtual baseada em docagem molecular surgem como importante alternativa para seleção *in silico* das substâncias a serem avaliadas, o que pode acelerar e reduzir os custos na descoberta de novos fármacos. Tendo em vista o potencial dos derivados de tioureias como possíveis inibidores da enzima HadAB, realizou-se uma triagem virtual baseada em docagem molecular de 99 benzoiltioureias presentes na quimioteca do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed), visando identificar potenciais inibidores dessa enzima com possível atividade antimicobacteriana. Iniciou-se o trabalho com a validação do protocolo de docagem molecular pelo método de redocagem, considerando-se a ausência ou presença de moléculas de água no complexo e, quando presentes, foi avaliada a influência da flexibilidade delas no protocolo estabelecida. Assim, a função GoldScore foi escolhida para ser utilizada na docagem molecular, onde as moléculas de águas mantidas flexíveis em até 1,0 Å. Em seguida, os ligantes foram preparados considerando-se a possível oxidação das tioureias em seus respectivos ácidos sulfênicos pela enzima micobacteriana EthA, uma vez que esse processo é bastante conhecido e já relatado na literatura para o **ISO**. Por fim, o processo de triagem virtual foi realizado e quatro substâncias e seus respectivos estereoisômeros (**4**, **6**, **79** e **80**) foram selecionadas para avaliação de suas interações por apresentarem valores de *fitness score* (FS) promissores. Essa análise demonstrou que tais estruturas realizam interações com resíduos essenciais para o mecanismo catalítico da enzima, bem como para o reconhecimento molecular, o que constitui importantes indícios de que possam atuar como potenciais inibidores do alvo HadAB. Além disso, aspectos de fármaco-similaridade avaliados pelo conjunto de regra dos cinco de Lipinski e extensão de Veber revelaram características fármaco-similares melhoradas quando comparados com **ISO**. Entretanto, preocupações com a elevada lipossolubilidade das tioureias indicam a necessidade de se desenvolver tecnologias para liberação de fármacos como meio para veiculação do ligante, visando a confirmação experimental *in vitro* dos resultados obtidos *in silico*.

Palavras-chave: Docagem molecular; Tuberculose; Triagem virtual; Benzoiltioureias; Isoxil.

ABSTRACT

MILANI, Vinicius de Melo Milani. **ESTUDO *IN SILICO* DE TIOUREIAS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA HADAB**. 2023. 107 sheets. Qualification (Pharmaceutical Science's Master Degree Program) – Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, 2023.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, which is a major global concern. Occurrences of resistant strains of this infectious agent are an aggravating factor, thus increasing the need to search for new treatment alternatives for this disease that has plagued humanity for millennia. Isoxil (**ISO**), also known as Thiocarlide, is an essential antimycobacterial agent from the thiourea class, which was used to control TB cases in the 1960s. However, it fell into disuse due to its low oral bioavailability. Mechanisms reported in the literature associate its activity with the ability to inhibit (3R)-hydroxyacyl-ACP-dehydratase (HadAB), an enzyme that participates in the biosynthesis of mycolic acids, which make up the structure of the mycobacterial cell wall. Computational virtual screening studies based on molecular docking emerge as an essential alternative for the *in silico* selection of substances to be evaluated, which can accelerate and reduce costs in discovering new drugs. Considering the potential of thiourea derivatives as possible inhibitors of the HadAB enzyme, a virtual screening based on molecular docking of 99 benzoylthioureas present in the chemical library of the Medicinal Molecule Synthesis Laboratory (LaSMMed) was carried out, aiming to identify potential inhibitors of this enzyme with possible antimycobacterial activity. Work began with validating the molecular docking protocol using the redocking method, considering the absence or presence of water molecules in the complex and, when present, evaluating the influence of their flexibility on the established protocol. Thus, the GoldScore function was chosen for molecular docking, where water molecules are kept flexible by up to 1.0 Å. Next, the ligands were prepared considering the possible oxidation of thioureas to their respective sulfenic acids by the mycobacterial enzyme EthA since this process is well known and has already been reported in the literature for the ISO. Finally, the virtual screening process was carried out, and four substances and their respective stereoisomers (**4**, **6**, **79**, and **80**) were selected to evaluate their interactions as they presented promising fitness score (FS) values. This analysis demonstrated that such structures carry out interactions with residues essential for the enzyme's catalytic mechanism and molecular recognition. It constitutes substantial evidence that they can act as potential inhibitors of the HadAB target. Furthermore, aspects of drug-similarity evaluated by Lipinski's Rule of Five and Veber extension revealed improved drug-similar characteristics when compared with ISO. However, concerns about the high liposolubility of thioureas indicate the need to develop technologies for drug release as a means for ligand delivery, aiming for *in vitro* experimental confirmation of the results obtained *in silico*.

Key-words: *Molecular docking*; Tuberculosis; Virtual Screening; Benzoylthioureas; Isoxyl.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transmissão por via respiratória do Mtb.	15
Figura 2. Estruturas dos fármacos de primeira escolha utilizados.....	17
Figura 3. Estrutura dos fármacos de segunda escolha empregados para TB.	18
Figura 4. Coloração ZN em amostra clínica de Mtb observada em escarro.	22
Figura 5. Esquema das estruturas que compõe a parede celular do Mtb.	23
Figura 6. Estrutura química dos ácidos micólicos (AM).	24
Figura 7. Mapa da via metabólica FAS-II para obtenção de AM.	25
Figura 8. Estrutura cristalográfica tridimensional da MtbHadAB.....	27
Figura 9. Mecanismo de reação para a conversão do β -hidroxilacil-ACP à trans-2-enoil-ACP pela MtbHadAB.	28
Figura 10. Estrutura molecular do Isoxil (ISO , Tiocarlida).	29
Figura 11. Via de ativação do ISO e posterior formação de ligação covalente com resíduo de cisteína Cys61 (A).	30
Figura 12. Estruturas de tioureias avaliadas por Reddy e colaboradores.....	33
Figura 13. Estruturas dos compostos Bioisos-4 , Bioisos-5 , Bioisos-9 e Bioisos-13 obtidas pela técnica de bioisosterismo empregada por Dogan e colaboradores.	34
Figura 14. Planejamento empregado para o desenvolvimento das estruturas de benzoiltioureias da quimioteca.	36
Figura 15. Modelo de estrutura básica da nanoestrutura formada no lipossoma.	38
Figura 16. Organização da bicamada lipídica entre os tipos de lipossomas.	39
Figura 17. Exemplos de fosfolípídeos empregados no preparo de lipossomas.....	40
Figura 18. Padrões de oxidação esperados para as tioureias ISO , benzoiltioureias e tioureias derivadas do ácido cinâmico.	42
Figura 19. Estruturas moleculares dos ligantes FSE , HCC e BUN	44
Figura 20. Interações do ligante FSE com moléculas de água e resíduos próximos no complexo 4RLT.....	45
Figura 21. Alvo molecular com a sobreposição em zoom dos complexos obtidos nas configurações de água mencionadas.....	50
Figura 22. Parâmetros utilizados no docagem para as estruturas de interesse.	51
Figura 23. Avaliação tridimensional das interações com o composto 4-O-(R,R)	54
Figura 24. Avaliação tridimensional das interações com o composto 4-O-(R,S)	55

Figura 25.	Avaliação tridimensional das interações com o composto 4-O-(S,S)	56
Figura 26.	Avaliação tridimensional das interações com o composto 6-O-(S,S)	58
Figura 27.	Avaliação tridimensional das interações com o composto 6-O-(R,S)	59
Figura 28.	Avaliação tridimensional das interações com o composto 6-O-(R,R)	60
Figura 29.	Avaliação tridimensional das interações com o composto 79-O-(R)	61
Figura 30.	Avaliação tridimensional das interações com o composto 79-O-(S)	62
Figura 31.	Avaliação tridimensional das interações com o composto 80-O-(R)	63
Figura 32.	Avaliação tridimensional das interações com o composto 80-O-(S)	64
Figura 33.	Aspectos fármaco-similares obtidos para avaliação da regra dos cinco de Lipinski para ISO e para as benzoiltioureias.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de RMSD e Fitness Score (FS) obtidos para as 10 corridas em cada função de pontuação analisada, na presença das moléculas de água selecionadas, consideradas rígidas.	46
Tabela 2. Resultados de Fitness Score (FS) e RMSD para as três condições de redocagem na função GoldScore.	47
Tabela 3. Valores de RMSD e Fitness Score (FS) obtidos para a condição de água configurada em 1 Å para as quatro funções de pontuação.	48
Tabela 4. Sobreposição dos ligantes extraídos em complexos considerando ligante tratado, água flexível, água fixa comparadas com o ligante bruto.	49
Tabela 5. Valores de FS para os complexos selecionados.	52
Tabela 6. Estruturas selecionadas dentre os 10 primeiros colocados.	53
Tabela 7. Parâmetros obtidos pela plataforma SwissADME para os ligantes e ISO	66
Tabela 8. Resumo do preparo e resultados dos testes de solubilidade realizados..	69
Tabela 9. Parâmetros obtidos para cada lipossoma preparado.	71
Tabela 10. Concentrações de substância bioativa nos lipossomas preparados e valores corrigidos com eficiência de encapsulamento.	72
Tabela 11. Concentração dos pontos utilizados para construção das curvas de calibração para cada composto e respectivos coeficientes de correlação.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4RLT	Código para o complexo <i>MtbHadAB</i> com fisetina
4RLU	Código para o complexo <i>MtbHadAB</i> com 2',4',4'-trihidroxichalcona
4RLW	Código para o complexo <i>MtbHadAB</i> com buteína
Å	Angstrom – unidade de medida de comprimento
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i> (Proteína Carreadora de Acil)
ADMET	Propriedades farmacológicas de A bsorção, D istribuição, M etabolização, E xcreção e T oxicidade.
AG	Arabinoglicanos
Ala	Alanina
ALH	Aceptores de Ligação de Hidrogênio
AM	Ácidos Micólicos
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato (Ácido Aspártico)
ASP	Função de pontuação disponível no GOLD
BUN	Buteína
CADD	<i>Computer-Aided Drug Discovery</i> (Descoberta de Fármacos auxiliada por computadores)
ChemPLP	Função de pontuação disponível no GOLD

ChemScore	Função de pontuação disponível no GOLD
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CYP	Citocromo P
Cys	Cisteína
Da	Daltons – unidade de medida de peso molecular
DLH	Doadores de Ligação de Hidrogênio
EE	Eficiência de encapsulamento
EMB	Etambutol
EthA	Flavina Monoxigenase de TB
FAS-I	<i>Fatty Acid Synthase type I</i>
FAS-II	<i>Fatty Acid Synthase type II</i>
FSE	Fisetina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato (Ácido Glutâmico)
Gly	Glicina
GoldScore	Função de pontuação disponível no GOLD
HadAB	Heterodímero A da MtbHadAB
HadBC	Heterodímero B da MtbHadAB

HCC	2',4',4'-trihidroxichalcona
His	Histidina
HOH	Água (Modelo Cristalográfico)
Ile	Isoleucina
INH	Isoniazida
ISO	Isoxil
KasA	Proteína β -Cetoacil Carreadora
Leu	Leucina
LogP	Coefficiente de Partição
MDR-TB	<i>Multiple Drug Resistant-TB</i>
Met	Metionina
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (Concentração Inibitória Mínima)
mLogP	Coefficiente de Partição de Moriguchi
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MtbHadAB	(3R)- β -Hidroxilacil-ACP Desidratase
nrot	Número de ligações rotativas
PDB	<i>Protein Data Bank</i> – banco de dados cristalográficos
Phe	Fenilalanina

PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
RR-TB	<i>Rifampicin Resistant-TB</i>
SBDD	<i>Structure-Based Drug Discovery</i> (Descoberta de Fármacos Baseada em Estrutura)
TB	Tuberculose
TGI	Trato Gastrointestinal
Thr	Treonina
TPSA	Topological Polar Surface Area
Tyr	Tirosina
Val	Valina
VS	<i>Virtual Screening</i> (Triagem Virtual)
XDR-TB	<i>Extensively Drug Resistant-TB</i>
ZN	Ziehl-Neelsen
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (Desvio Padrão Quadrático Médio)
FS	<i>Fitness Score</i> (Pontuação de Ajuste Espacial)
MM2	Tipo de campo de força para otimização de estruturas tridimensionais
SPC	Fosfatidilcolina de Soja

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	TUBERCULOSE (TB).....	14
1.1.1	Epidemiologia.....	15
1.1.2	Esquemas Terapêuticos e Resistência Micobacteriana	16
1.2	TÉCNICAS <i>IN SILICO</i> APLICADAS PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS	18
1.2.1	Aspectos Estruturais Do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e possíveis alvos moleculares.....	21
1.2.2	Isoxil (ISO) Como Protótipo Para Tioureias Com Potencial Anti-TB	29
1.2.3	Tioureias: Classe Promissora Na Pesquisa De Fármacos Anti-TB	32
1.2.3.1	Tioureias presentes na quimioteca do LasMMed	35
1.3	LIPOSSOMAS COMO ALTERNATIVA PARA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS.....	37
2	OBJETIVOS	41
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1	DESENHO DE TIOUREIAS COM POTENCIAL ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA (3R)-B-HIDROXIACIL-ACP-DESIDRATASE (MTBHADAB)	42
3.2	VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE DOCAGEM	43
3.3	TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM DOCAGEM MOLECULAR	52
3.4	PREVISÕES <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS DE FÁRMACO-SIMILARIDADE	66
3.4.1	Testes de Solubilidade	69
3.5	OBTENÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	70
4	METODOLOGIA	74
4.1	TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM DOCAGEM MOLECULAR	74
4.1.1	Obtenção e Preparação da Estrutura Tridimensional do Alvo Molecular (HadAB)	74
4.1.2	Desenho e Otimização de Ligantes.....	74
4.1.3	Docagem Molecular	74
4.1.4	Previsões <i>In Silico</i> de Parâmetros de Fármaco-similaridade	75
4.2	PREPARO DOS LIPOSSOMAS.....	76

4.2.1	Preparo do filme lipídico e hidratação do filme.....	76
4.2.2	Caracterização dos Lipossomas	76
4.2.3	Doseamento do fármaco	77
4.2.3.1	Espectro de varredura dos ligantes.....	77
4.2.3.2	Curvas de calibração.....	77
4.2.4	Eficiência de encapsulamento (EE).....	78
5	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS.....	82
	APÊNDICES.....	73
	APÊNDICE A – Estruturas avaliadas	74
	APÊNDICE B – Diagramas de interação.....	96
	APÊNDICE C – APÊNDICE B Gráficos UV-Vis	86
	APÊNDICE D – Resultados de DLS e Potencial Zeta para as Formulações Construídas.....	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE (TB)

A Tuberculose (TB) é uma doença antiga que afeta os seres humanos há milhares de anos. As primeiras menções escritas à tuberculose foram encontradas na Índia (3.300 anos atrás) e na China (2.300 anos atrás) (CDC, 2023). Na Idade Média, a escrófula, doença que afeta os gânglios linfáticos cervicais, foi descrita como uma forma clínica de TB. A doença era conhecida na Inglaterra e na França como “mal do rei”, e acreditava-se amplamente que as pessoas afetadas poderiam curar após um toque real (BARBERIS et al., 2017). Em 1720, o médico inglês Benjamin Marten foi o primeiro a conjecturar que a TB poderia ser causada por um agente infeccioso (RUTGERS UNIVERSITY, 2023). No entanto, só em 1882 é que o médico alemão Robert Koch descobriu a bactéria responsável pela TB, denominada *Mycobacterium tuberculosis*, e provou que a TB era uma doença infecciosa.

Atualmente, sabe-se que a TB é uma doença infecciosa contagiosa e crônica que pode se manifestar de diferentes formas, sendo a mais comum a tuberculose pulmonar, que afeta os pulmões. Os principais sintomas da TB pulmonar incluem: tosse (geralmente com muco ou sangue), dor no peito, dor ao respirar ou tossir, febre, calafrios, sudorese noturna, perda de peso e fadiga. Esses sintomas podem variar dependendo do estágio da doença e do sistema imunológico do indivíduo. Em alguns casos, as pessoas com TB pulmonar podem não apresentar quaisquer sintomas, especialmente nas fases iniciais da doença (HEEMSKERK et al., 2015).

No entanto, a TB também pode afetar outras partes do corpo, uma condição conhecida como TB extrapulmonar. Existem vários tipos de TB extrapulmonar, tais como: linfadenite tuberculosa, que afeta os gânglios linfáticos e é a forma mais comum de tuberculose extrapulmonar. meningite tuberculosa, uma forma rara de tuberculose que afeta o cérebro e a medula espinhal; TB miliar, que afeta o fígado, o baço e a medula óssea, sendo potencialmente fatal, dentre outras (LEE, 2015).

Quando uma pessoa com tuberculose fala, tosse ou espirra, aerossóis contendo *Mtb* são expelidos para o ar. Se uma pessoa sadia os inalar, ela poderá ser

infectada, este ciclo pode ser observado como exemplificado na **Figura 1**. No entanto, nem todas as pessoas infectadas ficam doentes. Como resultado, existem duas condições relacionadas com a TB: infecção latente por TB e tuberculose ativa. No primeiro estado, a bactéria está dormente no corpo e não causa nenhum sintoma e as pessoas infectadas não podem transmitir a doença. O único sinal de infecção por TB é uma reação positiva ao teste cutâneo de tuberculina. Quando o bacilo se torna ativo e começa a se multiplicar, a pessoa desenvolve TB ativa. Neste estado, a pessoa passa a manifestar os sintomas típicos da doença e podem transmitir a TB a outras pessoas, especialmente se a bactéria da TB estiver nos pulmões (CDC, 2014).

Figura 1. Transmissão por via respiratória do *Mtb*.



Fonte: Próprio autor. Da esquerda para direita pode-se observar uma sequência de eventos envolvidos no ciclo de transmissão do *Mtb*. Uma pessoa portadora do *Mtb* expele aerossóis contendo o agente infeccioso através da tosse, fala ou espirro, que logo em seguida, são inalados por um indivíduo sadio.

1.1.1 Epidemiologia

Apesar dos progressos significativos na prevenção e no tratamento da TB, esta continua a ser uma grande preocupação de saúde global, com milhões de pessoas afetadas pela doença todos os anos. Em 2022, a TB continua sendo a segunda maior causa de mortes associadas a apenas uma infecção, seguido da COVID-19. No mesmo ano, 2022, houve pelo menos 7,5 milhões de novos casos reportados, sendo o maior número da série histórica desde o início do monitoramento

da TB em 1995. Ademais, ao todo no mundo, cerca de 10,6 milhões de indivíduos desenvolveram TB. Deste total de casos reportados, cerca de 1,30 milhões de indivíduos tiveram a morte como desfecho, sendo um número ligeiramente menor quando comparado com os períodos anteriores de 2021 e 2020 (BRASIL., 2019; WHO, 2023).

Estima-se que pelo menos 3,0% da carga mundial de TB seja representada pela região das Américas. O Brasil está inserido no grupo dentre os países que possuem maior carga de TB, representando uma contribuição de 33% dos casos. Nos últimos 10 anos, foram diagnosticados 71 mil novos casos em média no Brasil, com uma taxa de incidência que varia de 10,0 a 80 casos por 100 mil habitantes. No ano de 2023 o Brasil apresentou uma incidência da tuberculose de 37 casos por 100 mil habitantes, número ligeiramente maior que o período anterior de 2022 com 36,3 casos por 100 mil habitantes. Apesar do que esse aumento pode sugerir, a taxa de incidência encontra-se ainda menor do que o observado para o período de 2019, período de maior incidência da série histórica que sofre ruptura com o surgimento da COVID-19 (BRASIL., 2019; BRASIL, 2024).

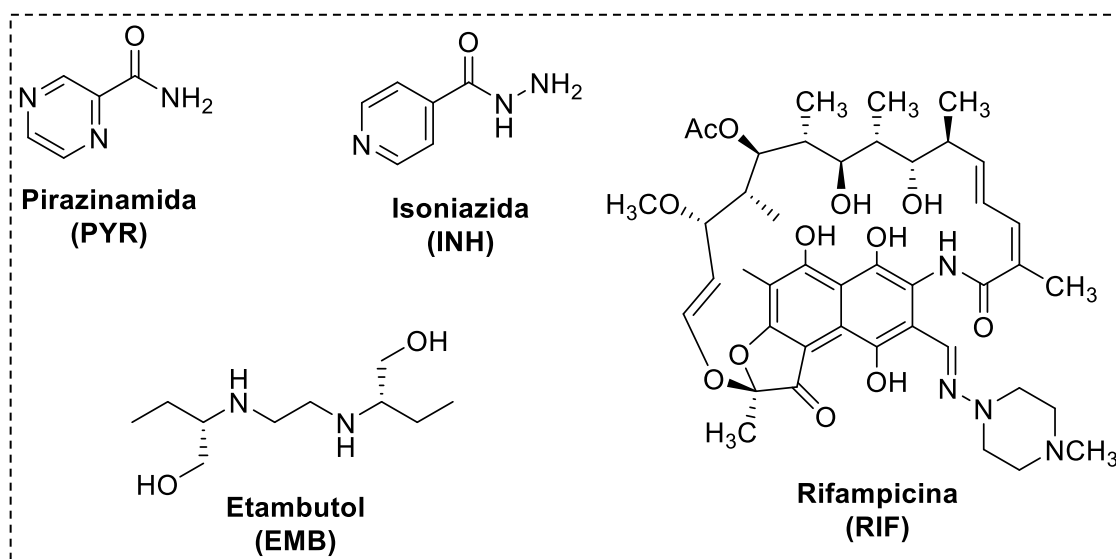
O número de casos de TB-resistentes identificados em 2022, se manteve estável, sendo isso um reflexo do período da pandemia de COVID-19 (2020-2022). Ao todo no mundo, foram 410 mil casos estimados de *MDR/RR-TB* sendo que, 3,3% destes estão inseridos como novos casos. No mesmo ano de 2022, cerca de 27 mil casos foram categorizados como *XDR-TB*, confirmados por exames bacteriológicos. Em 2021, estimou-se que pelo menos 191 mil casos de *MDR-TB* tiveram óbito como desfecho (WHO, 2023).

1.1.2 Esquemas Terapêuticos E Resistência Micobacteriana

As indicações para tratamento intensivo inicial da TB-sensível em adultos constituem uma combinação de medicamentos, também conhecidos como fármacos de primeira escolha (**Figura 2.**), sendo eles a rifampicina (**RIF**), pirazinamida (**PZA**), etambutol (**EMB**) e isoniazida (**INH**) tendo uma duração média de 2 meses na primeira fase de tratamento. Em crianças o mesmo combo pode ser utilizado, porém sem a presença de **EMB**. A fase de manutenção do tratamento inclui apenas a **RIF** e **INH**, com uma duração média de 4 meses, totalizando uma duração de 6 meses de tratamento (BRASIL., 2019; WHO, 2022).

A extensa duração do tratamento e os efeitos adversos observados para esses fármacos constituem fatores importantes para desenvolvimento da resistência bacteriana, pois conduzem a elevadas taxas de abandono do tratamento. Nesses casos, pode-se empregar os fármacos de segunda escolha (**Figura 3**), tais como fluoroquinolonas, como levofloxacino, moxifloxacino e gatifloxacino; fármacos injetáveis como amicacina, capreomicina e estreptomicina; outros fármacos como etionamida, protionamida, bedaquilina, dentre outros (BRASIL., 2019; RENDON et al., 2016; WHO, 2022). Entretanto, esses fármacos são menos potentes e mais tóxicos do que os de primeira escolha, elevando a duração e custo do tratamento, o que dificulta a adesão dos pacientes ao tratamento, o que pode conduzir a falhas terapêuticas e surgimento de cepas ainda mais resistentes.

Figura 2. Estruturas dos fármacos de primeira escolha utilizados.

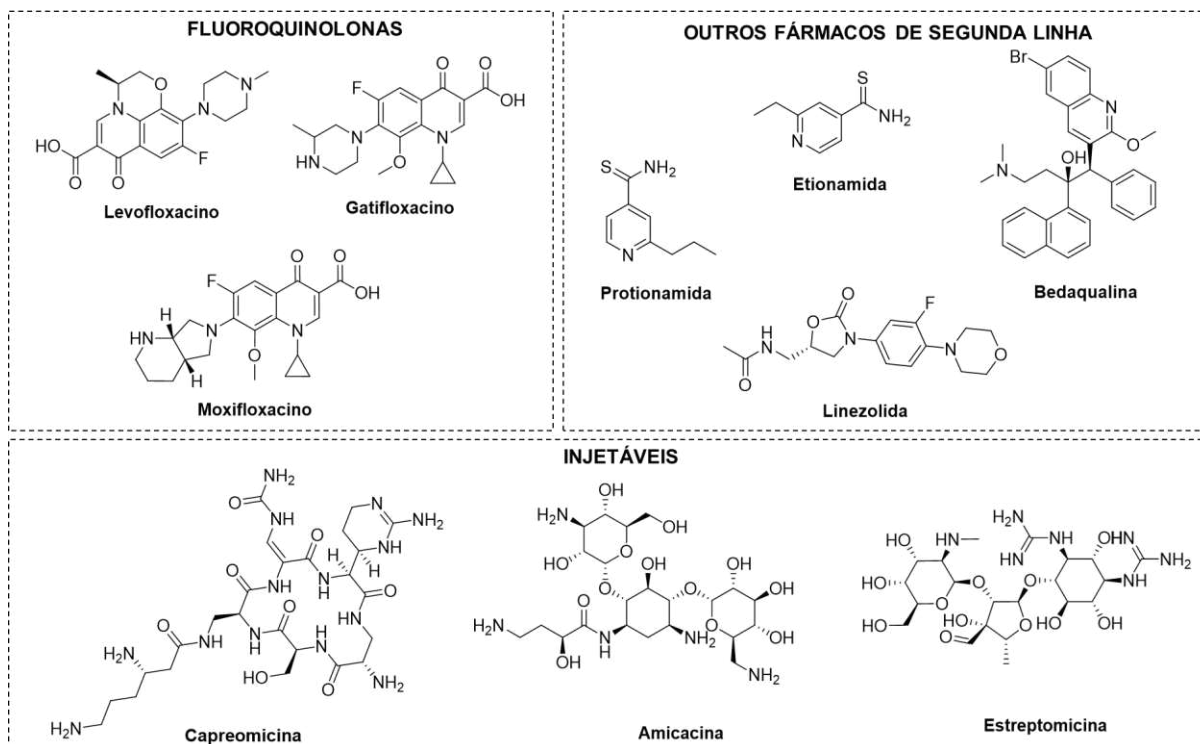


Fonte: Próprio autor.

Os tipos de TB-resistentes observados vão depender do tipo de resistência que as cepas de *Mtb* apresentam frente aos fármacos de primeira e segunda escolha mencionados anteriormente (RENDON et al., 2016; WHO, 2022). Cepas de TB que apresentam resistência à **RIF** são definidas como *RR-TB* (do inglês, *rifampicin resistant-TB*), sendo um dos tipos mais comuns de resistência observada. Além da resistência à **RIF**, em conjunto, pode-se observar a resistência também à **INH**, configurando o tipo *MDR-TB* (do inglês, *multidrug-resistant TB*). As cepas *MDR-TB* ainda podem desenvolver resistência a um dos fármacos injetáveis de segunda escolha e a alguma fluoroquinolona, sendo classificadas como *XDR-TB* (do inglês,

extensively drug resistant TB) (BRASIL., 2019; RENDON et al., 2016; WHO, 2022).

Figura 3. Estrutura dos fármacos de segunda escolha empregados para TB.



Fonte: Próprio autor. Na figura são mostradas as estruturas de alguns fármacos de segunda escolha citados e empregados no tratamento da TB.

1.2 TÉCNICAS IN SILICO APLICADAS PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

Tendo em vista a gravidade do panorama epidemiológico global da TB e do advento de cepas resistentes aos principais fármacos do arsenal terapêutico disponível para o seu tratamento, faz-se extremamente urgente e necessária a descoberta de novos fármacos anti-TB, que sejam mais potentes, eficazes frente a cepas resistentes e menos tóxicos, visando-se o estabelecimento de novas alternativas terapêuticas frente a essa enfermidade letal.

Entretanto, sabe-se que processo de descoberta de novos fármacos ocorre de maneira onerosa em diversos aspectos. Isso se deve pelo longo tempo de duração, alinhado com o alto custo financeiro e uma baixa taxa de sucesso. Portanto, a implementação de novas estratégias e processos para suplantar as dificuldades observadas são desejáveis. Nesse contexto, o processo de descoberta de novos fármacos auxiliados por computador (do inglês *computer-aided drug discovery*, *CADD*) surge como importante estratégia, pois propõe uma abordagem baseada no

conhecimento das estruturas do alvo molecular e seus possíveis ligantes. Dentre as abordagens de CADD, destaca-se a descoberta de fármacos baseado na estrutura do alvo molecular (do inglês, *structure-based drug discovery*, SBDD). Nesse âmbito, análises de fragmentos de fármacos frente à alvos moleculares já conhecidos são possíveis, fornecendo conhecimento para construção de modelos farmacofóricos. Além disso, podem ser aplicadas metodologias de triagem virtual (ou em inglês *virtual screening*, VS), que constituem um processo de avaliação extensiva de quimiotecas conhecidas por meio de métodos computacionais (MAIA et al., 2020). Dentre as possíveis técnicas para realização de triagens virtuais baseadas em estrutura (do inglês, *structure-based virtual screening* (SBVS), enfatiza-se a docagem molecular (ou do inglês *molecular docking*), que permitem prever e compreender o processo de reconhecimento molecular (MACALINO et al., 2015).

Muitos programas conhecidos podem ser empregados para realização do processo de SBVS, como AutoDock (MORRIS et al., 1998), DIVALI (CLARK; AJAY, 1995) e DARWIN (TAYLOR; BURNETT, 2000). Dentre estes um importante representante conhecido é o programa *Genetic Optimization for Ligand Docking* (GOLD). O método empregado pelo GOLD é capaz de, a partir de cadeias binárias (*genes*), codificar os graus de liberdade de um ligante avaliado. Estes *genes* são organizados em estruturas denominadas como cromossomos, sendo um conjunto de informações estruturais. Processos de mutação, portanto, podem ocorrer induzindo mudanças aleatórias de “*pose*”. A pose de menor energia global exibida por um ligante, é baseada em populações que são geradas sucessivamente a partir de cromossomos de menor energia selecionados (MENG et al., 2011).

Softwares utilizados em SBVS possuem meios de distinguir poses corretas, avaliar afinidades ligante-alvo molecular e discriminar potenciais ligantes dos ligantes inativos. Os meios para esse processo dependem funções de pontuação, que são utilizadas nestas avaliações e possuem características próprias. Existem quatro tipos principais sendo eles (a) baseado em campo de força; (b) baseado em conhecimento; (c) empíricas e; (d) híbridas. No GOLD, por exemplo, existe a função *GoldScore* sendo uma função baseada em campo de força que utiliza bases dos princípios físico-químicos, como interações intermoleculares e termos de solvatação para avaliação (MENG et al., 2011).

Além da função *GoldScore*, temos a *ChemScore* (GOLD), sendo categorizada como empírica, ou seja, utiliza dados experimentais e ajustados para

avaliar e descrever as interações ligante-alvo. A função *Astex Statistical Potential* (ASP) é semelhante a *ChemScore* pois, utiliza, tal qual, dados experimentais para explicar as interações entre ligante-alvo, contudo, as observações são filtradas por conceitos estatísticos de forma a selecionar as observações mais constatadas. Por fim, mas não menos importante, temos a função *Piecewise Linear Potential* (ChemPLP) considerada híbrida, é amparada em mais de um tipo de algoritmo (MENG et al., 2011).

As abordagens mencionadas servem como alternativas mais assertivas no contexto de descoberta de novos fármacos, já que permitem explorar de forma ampla os contextos das interações entre possíveis ligantes e alvos moleculares. A partir disso, é possível construir um conhecimento sólido sobre as particularidades dos ligantes acerca do seu ajuste e interação com alvos, permitindo discrepar e categorizar moléculas promissoras no âmbito da descoberta de novos fármacos.

Apesar dos estudos de SBVS serem informativos do ponto de vista de interação ligante-alvo, é desejável estabelecer alternativas para avaliação de parâmetros farmacocinéticos, estabelecendo-se um filtro para seleção de potenciais fármacos, sobretudo de uso oral. Nesse sentido, um dos principais parâmetros avaliados em estudos *in silico* é a biodisponibilidade oral. De forma associativa, é possível compreender e determinar a quantidade da substância que estará disposta para atingir o alvo terapêutico. Pelo emprego de filtros de fármaco-similaridade (do inglês, *drug-likeness*), é possível inferir se uma substância possui características desejáveis para apresentar uma absorção oral satisfatória. Neste contexto, os principais filtros que podem ser empregados são a “Regra dos Cinco” de Lipinski, em conjunto com as extensões de Veber (LIPINSKI et al., 2001; VEBER et al., 2002).

A “Regra dos Cinco” de Lipinski, elenca quatro propriedades físico-químicas da substância avaliada para que essa apresente características fármaco-similares, em relação a permeabilidade pelas membranas e absorção por via oral, sendo elas: (1) o $\text{Log P} < 5$ (ou $\text{mLogP} < 4,15$), (2) quantidade de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) < 10 , (3) quantidade de átomos doadores de ligação de hidrogênio < 5 e (4) massa molecular (MM) < 500 Da. É válido ressaltar que substratos para transportadores biológicos são exceção às regras. O conjunto destes fatores explica a capacidade da molécula em atravessar barreiras biológicas como membranas celulares e barreiras gastrintestinais do trato gastrintestinal (TGI).

(LIPINSKI et al., 2001).

De forma complementar às regras de Lipinski, Veber e colaboradores ao analisarem características de biodisponibilidade oral de mais de 1100 substâncias, estabeleceram padrões moleculares rigorosos para o parâmetro de polaridade dos compostos, sendo representado pelo valor limite para TPSA (do inglês *Topological Polar Surface Area*) de 140 Å. Avaliações acerca do TPSA garantem que a substância avaliada desempenhe satisfatoriamente a passagem por membranas celulares lipídicas, já que devido as interações intermoleculares, compostos polares apresentam dificuldades relacionadas a esse processo (VEBER et al., 2002). Outra característica avaliada por Veber está ligada ao número de ligações rotacionáveis presentes na estrutura (nrot). Uma grande flexibilidade da molécula, que está associada a um elevado nrot, pode aumentar a entropia conformacional, tornando-a menos propensa a adotar conformações necessárias para o transporte envolvido no processo de permeação por membranas biológicas. Portanto, o limite para nrot é de 10 (VEBER et al., 2002).

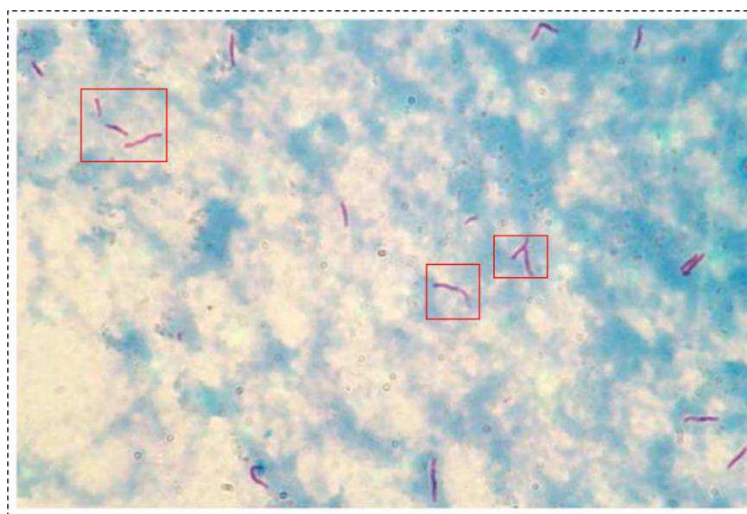
Para auxiliar nas predições a respeito das avaliações *in silico*, ferramentas importantes podem ser empregadas, como por exemplo o SwissADME. Essa plataforma se revela como um excelente instrumento para previsão dos parâmetros de fármaco-similaridade descritos por Veber et al. (2002) e Lipinski et al. (2001). Pelo emprego de um conjunto de dados, é possível realizar a predição de características físico-químicas e farmacocinéticas, o que permite inferir se uma determinada substância apresenta características fármaco-similares adequadas, possuindo assim uma probabilidade maior de se destacarem em outras fases de desenvolvimento (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

1.2.1 Aspectos Estruturais Do *Mycobacterium tuberculosis* e possíveis alvos moleculares

O *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (**Figura 4**) também conhecido como bacilo de Koch (BK), é uma bactéria patogênica em forma de bastonete, imóvel e não formadora de esporos, que mede 1 a 10 µm de comprimento. Possui uma parede celular rica em lipídeos, o que torna as células impermeáveis à coloração de Gram. Portanto, o *Mtb* pertence a categoria de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). A resistência aos ácidos é uma propriedade física que dá a estas bactérias a

capacidade de resistir à descoloração por ácidos durante procedimentos de coloração laboratorial. Uma vez corados, não podem ser descoloridos com os ácidos rotineiramente utilizados no processo, o que permite sua classificação e detecção. Esta propriedade torna a coloração ácido-resistente sensível e específica, particularmente no diagnóstico de *Mtb*, que pode ser realizado por microscopia de esfregaços de escarro, por meio da técnica de coloração Ziehl-Neelsen (ZN), demonstrada na **Figura 4** (KHUTLANG et al., 2010).

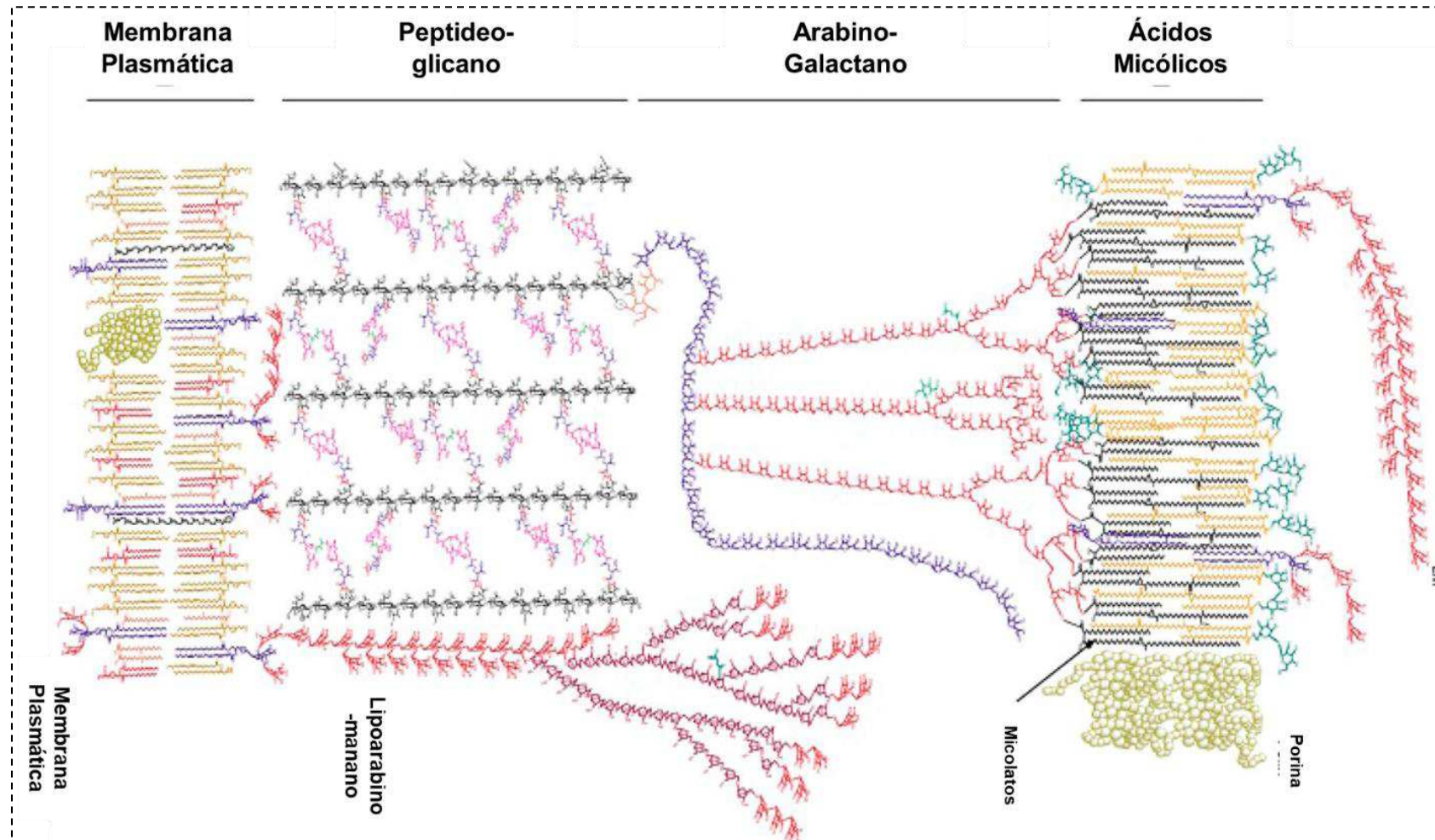
Figura 4. Coloração ZN em amostra clínica de *Mtb* observada em escarro.



Fonte: Adaptado de KHUTLANG et al., 2010. As regiões destacadas em retângulo vermelho destacam o *Mtb*, observado em coloração roxa.

A parede celular do *Mtb* desempenha várias funções cruciais, incluindo fornecer suporte estrutural, manter a forma celular e resistir à pressão de turgescência. Também desempenha um papel significativo na patogênese, bem como na resistência intrínseca aos antibióticos e na virulência. A estrutura complexa da parede celular, que inclui peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos (**Figura 2**), proporciona uma barreira a muitos medicamentos e possui bombas de efluxo, contribuindo para a resistência da bactéria aos agentes antimicrobianos. A composição e arquitetura únicas da parede celular do *M. tuberculosis* a tornam um alvo crítico para medicamentos anti-TB e um fator-chave no sucesso da bactéria como patógeno (HOLZHEIMER; BUTER; MINNAARD, 2021).

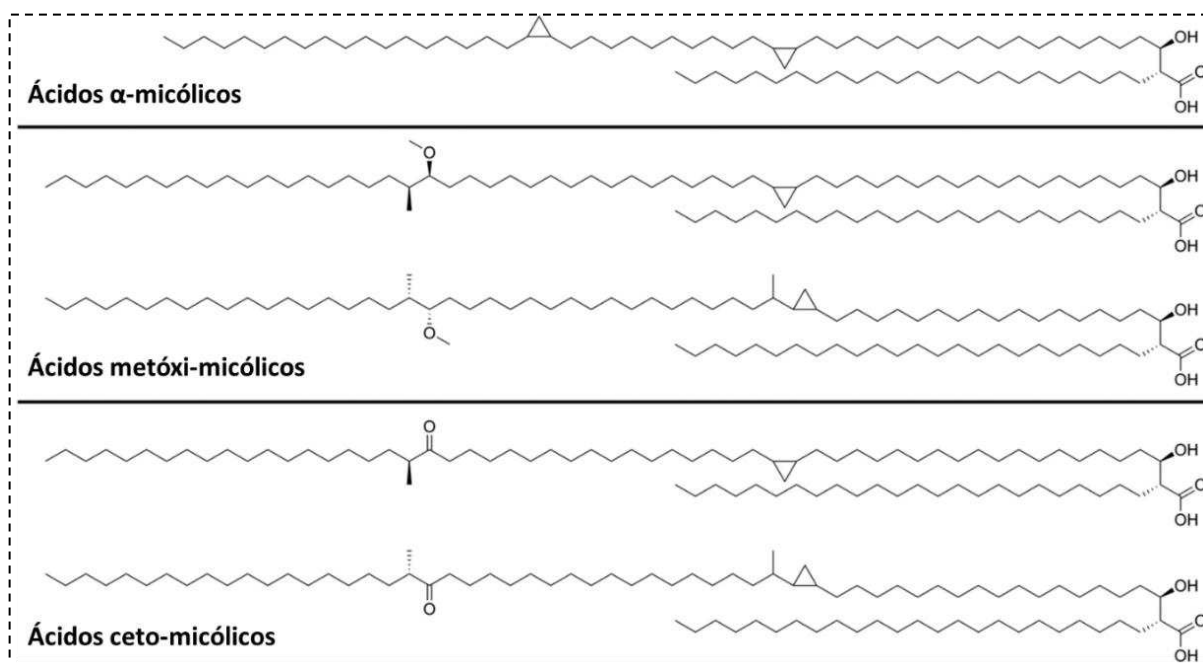
Figura 5. Esquema das estruturas que compõe a parede celular do Mtb.



Fonte: Adaptado de (HOLZHEIMER; BUTER; MINNAARD, 2021). A figura esquemática representa a organização da parede celular do Mtb com os componentes inseridos e estruturados.

Dentre os componentes da parede celular, destacam-se os lipídios conhecidos como α -alquil, β -hidroxi ácidos micólicos (AM, **Figura 3**), moléculas de cadeia longa ($C_{60} - C_{90}$), que se encontram esterificados a estruturas de heteropolissacarídeos conhecidos como arabinogalactanos (AG). Os AM ligados covalentemente na parede celular da micobactéria, em conjunto com os lipídeos livres presentes nas camadas internas e externas, formam bicamadas assimétricas e impermeáveis responsáveis pela característica resistente à muitos agentes terapêuticos (BIBENS et al., 2023; DONG et al., 2015b).

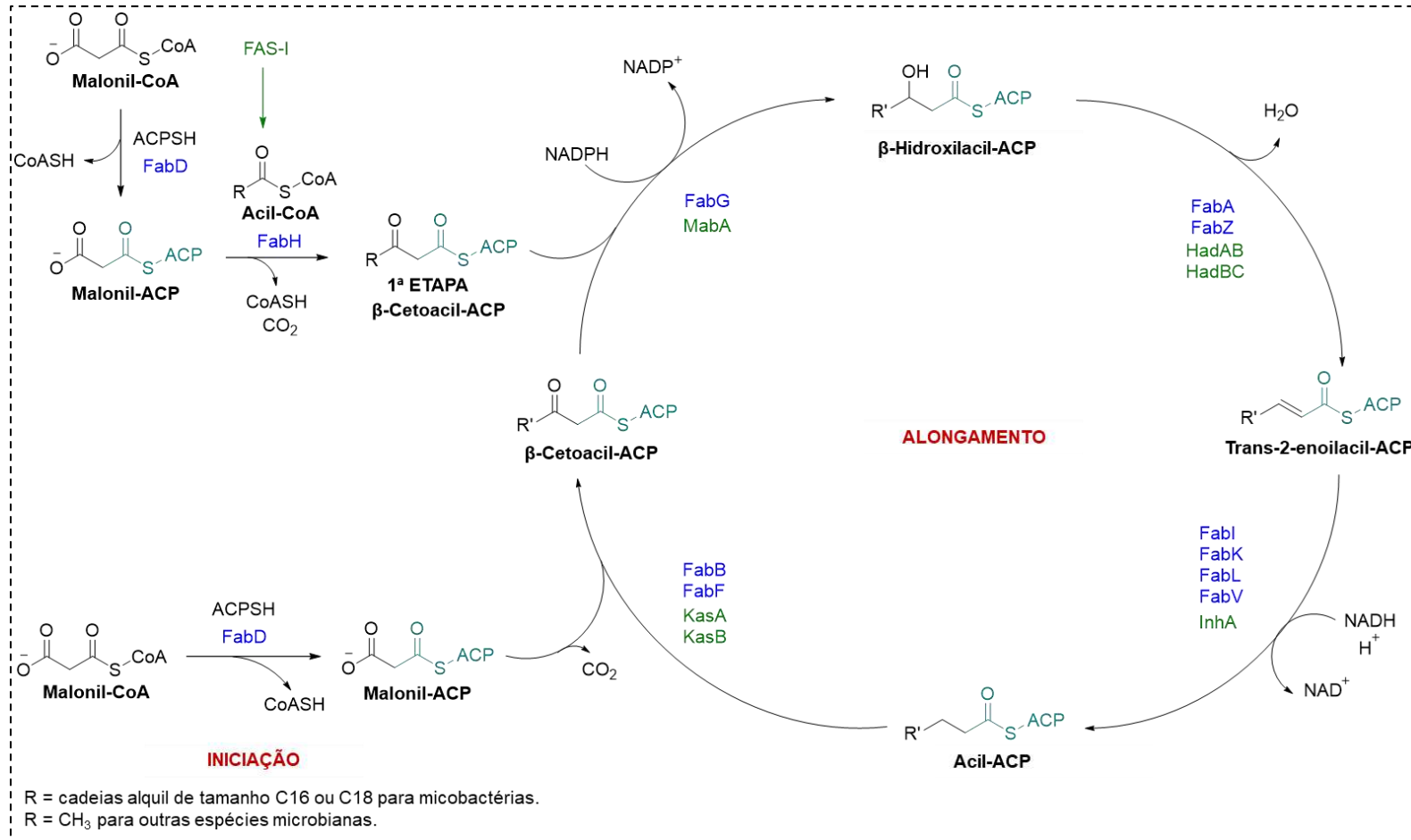
Figura 6. Estrutura química dos ácidos micólicos (AM).



Fonte: Adaptado de HOLZHEIMER; BUTER; MINNAARD, 2021. *Tipos de ácidos micólicos presentes na parede celular do Mtb são mostrados. As variações diferem pelo grau de oxidação do carbono próximo a metila em porção distal da cadeia maior.*

A formação dos AM ocorre por intermédio dos ciclos FAS-I (do inglês, *fatty-acid synthase type I*) e FAS-II (do inglês, *fatty-acid synthase type II*), sendo cada um responsável por etapas específicas da formação destes lipídios. O ciclo FAS-I está intimamente ligado à formação de cadeias α -alquil saturadas de tamanho intermediário (C_{24} ou C_{26}). Em sequência, o substrato para início do ciclo FAS-II trata-se do ceto-acil-ACP, de tamanho intermediário, que condensado ao malonil-CoA origina o β -hidroxilacil-ACP, conforme ilustrado na **Figura 7** (BIBENS et al., 2023; DONG et al., 2015b, 2015c).

Figura 7. Mapa da via metabólica FAS-II para obtenção de AM.

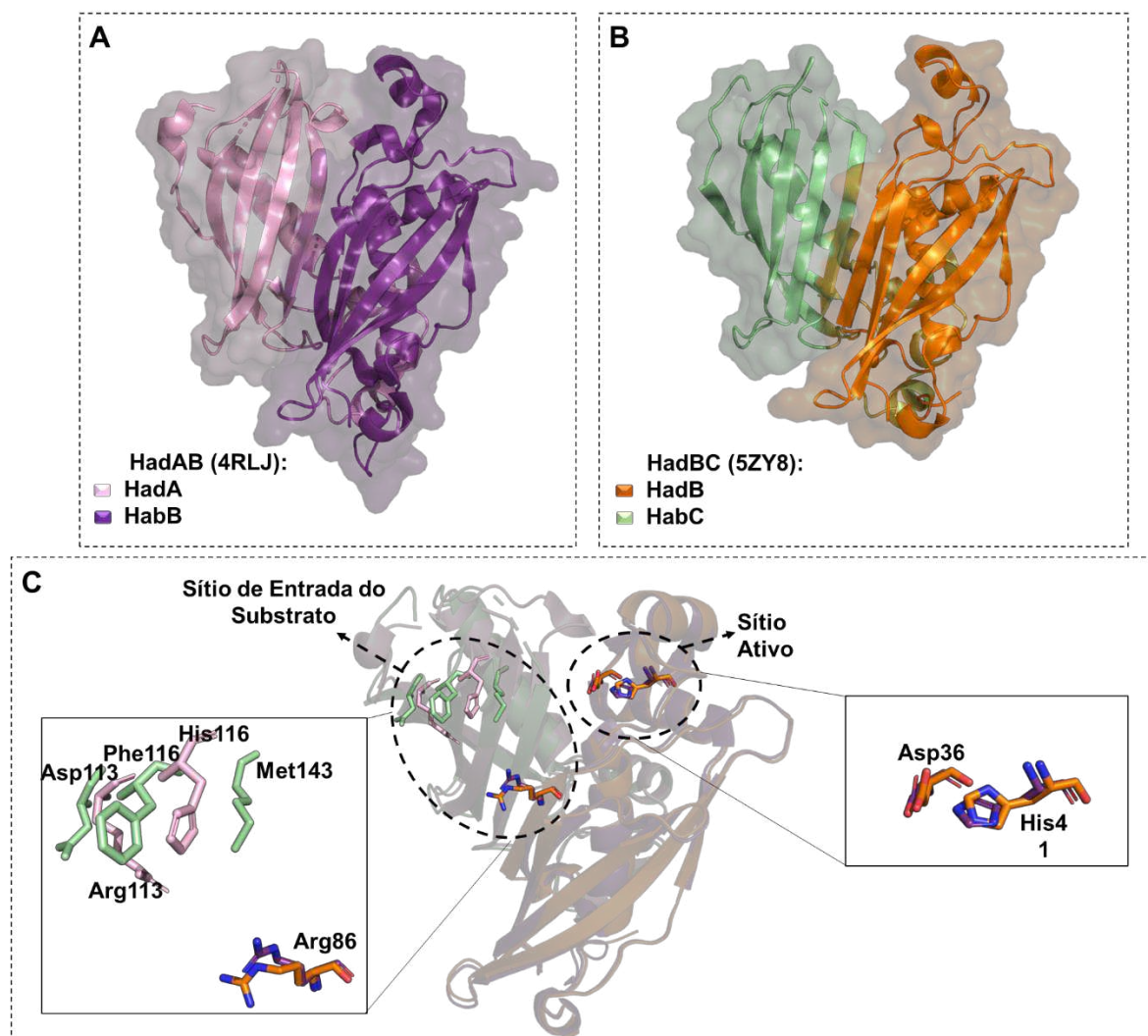


Fonte: Adaptado de BIBENS et al., 2023.

A enzima (3*R*)-hidroxilacil-ACP desidratase (*MtbHadAB*) integra o complexo FAS-II (do inglês, *fatty-acid synthase type II*), participando da terceira etapa de alongamento dos ácidos micólicos que integram a membrana celular do *Mycobacterium tuberculosis*. Sua ação baseia-se em uma desidratação do β -hidroxilacil-ACP para formação do intermediário trans-2-enoil-ACP. A constituição da enzima se dá pela união dos heterodímeros HadAB (*HadA*) e HadBC (*HadB*), que desempenham papéis distintos na atividade catalítica. O heterodímero *HadA* participa principalmente do início do alongamento da cadeia lipídica catalisando a formação das cadeias meromíclicas de tamanho intermediário, entre C₃₂ e C₄₂, sendo essa uma ação análoga tal qual a *KasA*. Já o heterodímero *HadB*, a partir das cadeias intermediárias formadas pelo *HadA*, participa das etapas tardias do alongamento até a formação da molécula de tamanho completo, entre C₅₂ e C₆₄ (DONG et al., 2015a; GAO et al., 2003; SACCO et al., 2007). Assim, percebe-se que a inibição dessa enzima impede uma etapa crucial do processo de biossíntese de ácidos micólicos, essenciais para a constituição da parede celular, implicando em um possível efeito antimicobacteriano.

Com relação a sua estrutura, cada um dos heterodímeros, *HadA* e *HadB*, se organiza em um formato de “dobra de cachorro-quente” que, logo depois, se associam de forma antiparalela, lado a lado. Devido as características de dobra que ambos possuem, a estrutura geral do complexo é conhecida por assumir uma forma de “dobra dupla de cachorro-quente” (**Figura 8**) (DONG et al., 2015b; MILANI et al., 2024). Como principais resíduos no sítio ativo temos a díade catalítica, formada por His41 (B) e Asp36 (B), que se localiza no heterodímero *HadB*. A díade catalítica encontra-se logo na entrada da cavidade de *HadB*, próximo de outros resíduos, sendo eles Asn38 (B), Ile40 (B), His41 (B), His58 (B), Gly59 (B) e Met60 (B), diferente de *HadA* que possui um revestimento no canal de ligação dos ácidos graxos, não possui um canal específico revestido (DONG et al., 2015b). O canal do heterodímero *HadA* que envolve interações hidrofóbicas realizadas com o substrato durante a atividade enzimática do complexo *MtbHadAB* inclui resíduos de aminoácidos como Tyr65 (A), Gln68 (A), Ala69 (A), Phe72 (A), Thr79 (A), Glu81-Ala-Gln-Ile-Val-Gln86 (A), e Leu142 (A). Tal organização estrutural sugere uma participação importante da díade na atividade catalítica da proteína (DONG et al., 2015a; LABONTE; TOWNSEND, 2013).

Figura 8. Estrutura cristalográfica tridimensional da MtbHadAB.



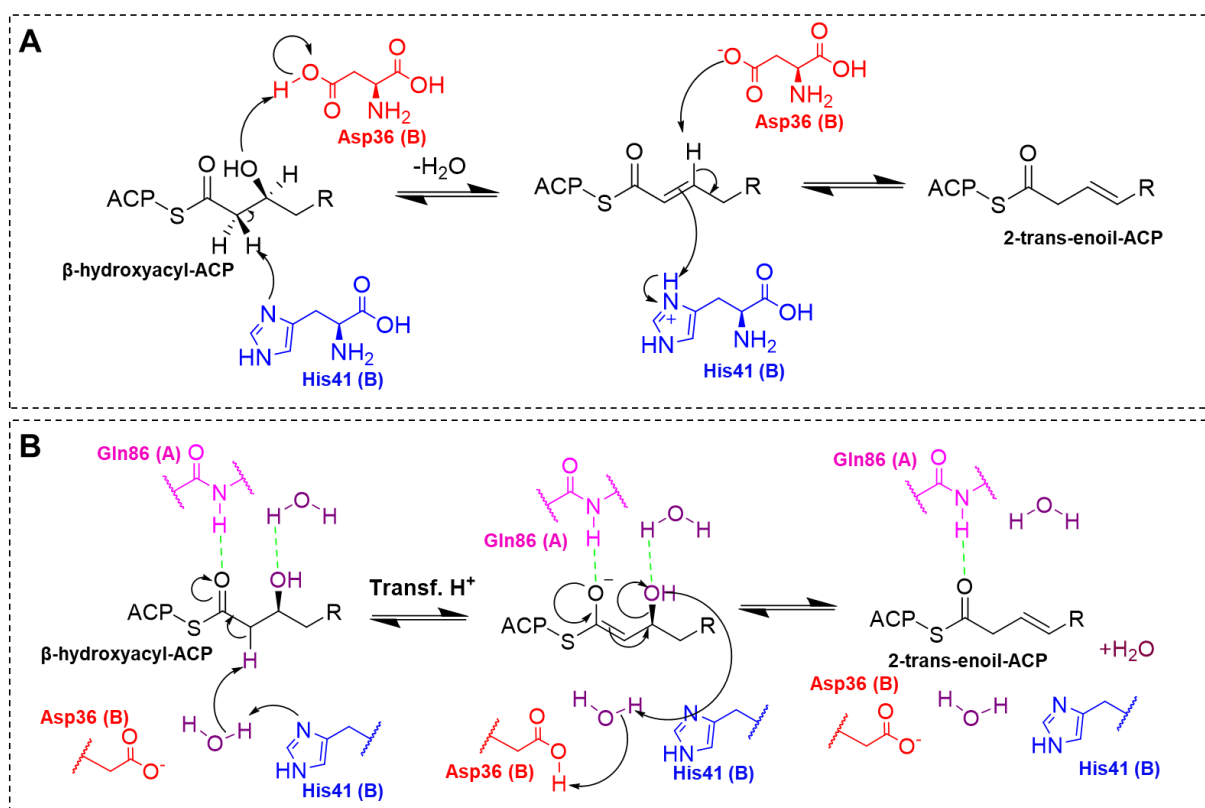
Fonte: Adaptado de MILANI et al., 2024. *Legenda de cores e representação:* A) Subunidade A (HadAB), que compõe o complexo MtbHadAB representada em cartoon destacando os monômeros componentes. B) Subunidade B (HadBC) que compõe o complexo MtbHadAB destacando os monômeros componentes. C) Destaque dos resíduos que compõe o sítio ativo e que integram o sítio de entrada do substrato no complexo MtbHadAB. As figuras foram construídas utilizando o software Pymol com os arquivos pdb relacionados em A e B.

O mecanismo de *MtbHadAB* inicia com uma transferência de um próton do intermediário β -hidroxilacil-ACP para o N do resíduo His41 (B). O grupo hidroxila ligado ao C_{β} é então protonado pelo resíduo Asp36 (B). Ao passo que a hidroxila é protonada, o grupo logo é expulso pela formação de uma dupla ligação resultante do próton transferido para His41 (B) que leva a formação de uma dupla ligação entre C_{α} e C_{β} . O final da conversão pelo complexo, então, se dá pela ação de Asp36 (B) que, atuando como uma base, captura o H olefínico formando uma nova ligação dupla ao passo que o resíduo His41 (B) doa o próton ao C_{α} concluindo a conversão de β -hidroxilacil-ACP em trans-2-enoil-ACP (ZHANG; MACHUTTA;

TONGE, 2010).

Apesar do mecanismo sugerido por Zhang e colaboradores, outras hipóteses podem estar envolvidas no mecanismo de conversão relatado. Singh e colaboradores observaram para 1,3-diarilpirazolil-acilsulfonamidas a participação de importantes resíduos de água fixa que podem ser intermediários na movimentação dos prótons relatados anteriormente. Um resíduo de água em particular age transferindo um próton, no início da conversão, para o resíduo His41 (B). Em quanto isso, outra molécula de água age como um ponto de ancoragem interagindo com a hidroxila ligada ao C β . A expulsão do agrupamento hidroxila do C β ocorre, também, intermediada pelo mesmo resíduo de água do início da conversão, no entanto, neste momento a transferência do próton desta molécula de água ocorre para o resíduo Asp36 (B). Ambos os mecanismos podem ser verificados na figura a seguir (SINGH et al., 2022; ZHANG; MACHUTTA; TONGE, 2010).

Figura 9. Mecanismo de reação para a conversão do β -hidroxilacil-ACP à trans-2-enoil-ACP pela *MtbHadAB*.



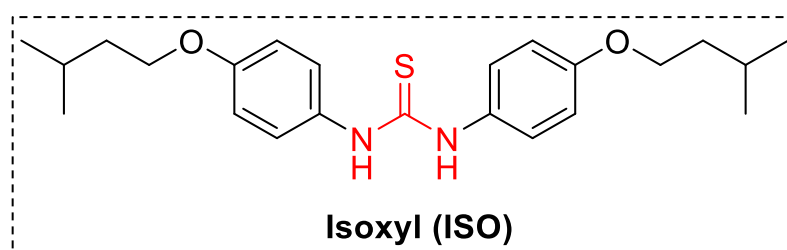
Fonte: Adaptado de Zhang et al., 2010 e SINGH et al., 2022 (SINGH et al., 2022; ZHANG; MACHUTTA; TONGE, 2010). As observações acerca do possível mecanismo para a formação do 2-trans-enoil-ACP a partir de β -hidroxilacil-ACP tem como pontos em comum o envolvimento dos resíduos da díade catalítica Asp36(B) e His41(B), contudo, Singh e colaboradores propõe ainda o envolvimento de duas moléculas de água, sendo uma delas catalítica, que intermedia a transferência de prótons. Além disso, um resíduo de Gln86(A) aparenta desempenhar uma importante ação como ponto de ancoragem.

As enzimas do sistema FAS-II são consideradas excelentes alvos moleculares devido a sua conservação em patógenos microbiológicos. Isso quer dizer que deficiências ou inativação de quaisquer uma destas importantes moléculas pode levar ao interrompimento da biossíntese de AM (CAREL et al., 2014). Adicionalmente, a ausência de enzimas como estas em humanos minimiza a possibilidade de efeitos adversos e viabilizam o desenvolvimento de inibidores específicos (BIBENS et al., 2023).

1.2.2 Isoxil (ISO) Como Protótipo Para Tioureias Com Potencial Anti-TB.

No contexto de fármacos anti-TB, podemos considerar o isoxil (**ISO**, **Figura 10**), também conhecido como tiocarlida, como o principal representante da classe das tioureias (REGO et al., 2018; WANG; HICKEY, 2010a). Esse fármaco foi sintetizado e relatado pela primeira vez em 1953, tendo seu uso clínico para TB iniciado em 1960. É insolúvel em água e apresenta uma estrutura simétrica devido a disposição de dois grupos idênticos ligados à porção central constituída pela tioureia, a qual é considerada o grupo farmacofórico. (PHETSUKSIRI et al., 1999a; WANG; HICKEY, 2010b).

Figura 10. Estrutura molecular do Isoxil (ISO, Tiocarlida).



Fonte: Próprio autor. A estrutura do ISO é mostrada acima destacando o grupo farmacoforo tiouréia em cor vermelha.

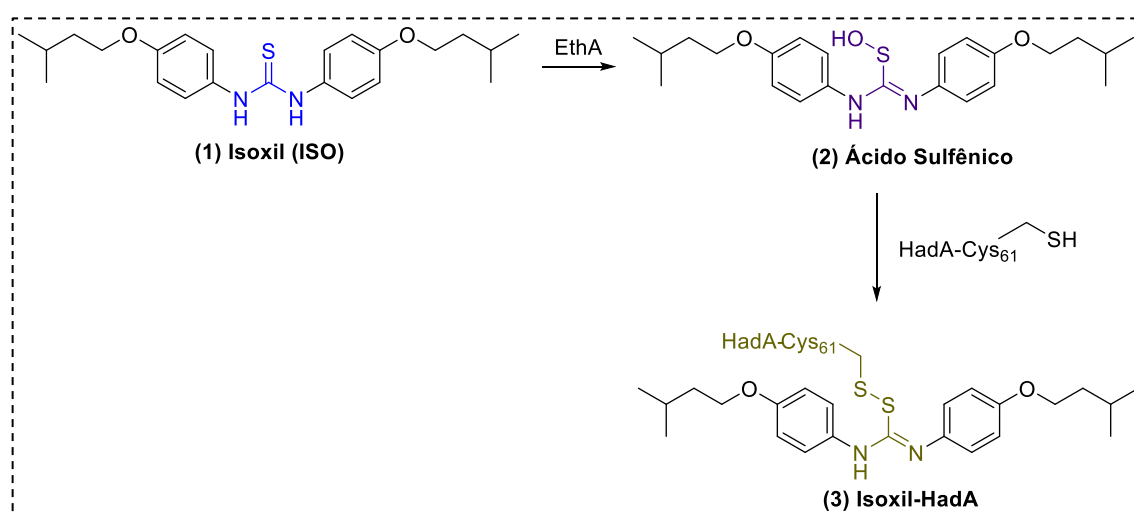
ISO demonstrou potência *in vitro*, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre < 1,0 µg/mL a 2,5 µg/mL frente a cepas sensíveis de TB (PHETSUKSIRI et al., 1999a). Além disso, outros estudos também relataram CIM do **ISO** no intervalo de 1,0 µg/mL a 10,0 µg/mL para cepas de diversos padrões de resistência de TB (PHETSUKSIRI et al., 1999b).

O uso do **ISO** como alternativa para o tratamento da TB, contudo, foi interrompido sendo tal fato associado a aspectos físico-químicos inadequados, que

impactam em sua baixa dissolução no trato gastrointestinal e, conseqüentemente, baixa absorção *in vivo* após administração oral. Isso leva a uma baixa distribuição sistêmica do **ISO**, inclusive em tecido pulmonar, o principal sítio de infecção do *Mtb*. Além disso, apenas uma parcela do **ISO** em local pulmonar pode penetrar nos granulomas e lesões causadas pela infecção e que se apresentam pouco vascularizadas (WANG; HICKEY, 2010b).

Hipóteses correlacionam o mecanismo de ação do **ISO** à capacidade de inibir a biossíntese de AM em etapas específicas do ciclo de obtenção deste lipídeo. Isso ocorre principalmente devido a capacidade em ligar-se a *MtbHadAB*, sendo uma enzima crucial no ciclo de alongamento das cadeias de AM no FAS-II. Esta atividade é desempenhada a partir da forma ativa do **ISO** gerada em uma etapa prévia de oxidação intermediada pela *EthA*, uma flavina monoxigenase que gera derivados de S-óxido pela oxidação do enxofre levando à formação de um ácido sulfênico, forma ativa do **ISO**. Sua forma ativa é capaz de estabelecer uma ligação covalente com um resíduo de cisteína (Cys61 (A)), presente no heterodímero A, constituindo uma ponte dissulfeto entre o ácido sulfênico e o resíduo. A necessidade de ativação prévia da estrutura do **ISO** configura-o, portanto, como um pró-fármaco (GRZEGORZEWICZ et al., 2015a; KORDULÁKOVÁ et al., 2007; LABORDE; DERA EVE; BERNARDES-GÉNISSON, 2017).

Figura 11. Via de ativação do **ISO** e posterior formação de ligação covalente com resíduo de cisteína Cys61 (A).



Fonte: Adaptado de GRZEGORZEWICZ et al., 2015b. **Legenda:** (1) em azul destaca-se o grupo farmacóforo tiouréia da estrutura do ISO. (2) em indigo o grupo tiouréia convertido a ácido sulfênico como produto da reação com EthA. (3) em bege a ponte dissulfeto formada a partir do ácido sulfênico previamente formado com o resíduo de Cys61 de HadA. A sequência de eventos ilustra o mecanismo proposto para inibição da *MtbHadAB* que ocorre desde a ativação até a formação do aduto covalente.

Um estudo conduzido por Grzegorzewicz e colaboradores utilizou o *Mycobacterium bovis* (BCG) como vetor de expressão de uma forma recombinante da HadAB com uma marcação de His no C-terminal. O objetivo deste estudo era avaliar a formação do complexo através da ligação covalente entre Cys61 (A) e o grupo tiocarbonila do **ISO**. O resultado do estudo revelou pela primeira vez que adutos covalentes entre Cys61 (A) e a forma ativa de **ISO**, seu ácido sulfênico correspondente. Sugere-se que a conversão de **ISO** para o ácido sulfênico correspondente, sua forma ativa, ocorra intermediada por uma flavina-monooxigenase conhecida como EthA. Após a conversão, o ácido sulfênico é capaz de formar uma ponte dissulfeto com o resíduo Cys61 levando à inativação da HadA (GRZEGORZEWICZ et al., 2015b).

Grzegorzewicz e colaboradores conduziram um estudo sobre a resistência relacionada a enzimas do ciclo FAS-II e ativação de **ISO**. Investigações foram conduzidas considerando quatro mutações (HadC^{V85I}, HadC^{T151V}, HadC^{A151V} e HadC^{K157R}) da subunidade HadC e avaliações sobre o impacto na resistência do *Mtb* (cepa H37Rv). O estudo também considerou uma forma mutante de Cys61 (A) e um isolado selvagem (HadWT) como controle (GRZEGORZEWICZ et al., 2020).

Ensaio bioquímicos evidenciaram que HadWT e cepas portadoras de mutação em HadA e HadC podem autorreplicar-se em meios sem adição de fármacos. Contudo, HadWT não exibiu crescimento em meio contendo fármaco, enquanto, a forma mutante de HadA permaneceu não afetada. A forma mutante de HadC apresentou decréscimo em sua replicação variando entre 7% a 24%(GRZEGORZEWICZ et al., 2020).

Os resultados encontrados revelaram que todas as quatro mutações mencionadas na subunidade C de HadBC impactam na estabilidade ou atividade do complexo *MtbHadAB*. Duas das mutações citadas e avaliadas pelo estudo (HadBC^{V85I} e HadBC^{K157R}) podem levar a formação de uma forma viável de *Mtb*, contendo uma forma de *HadABC knockout* que compensa a deficiência de HadAB explicando, desta forma, a resistência frente ao **ISO** (GRZEGORZEWICZ et al., 2020).

Após avaliações realizadas nos perfis dos AM provenientes das cepas que expressam a forma mutada de HadC, observou-se mudanças na atividade do complexo de biossíntese de AM. Isso sugere que mutações na subunidade C podem diminuir o alcance de HadAB à **ISO**, levando definitivamente a resistência. Essas

evidências enfatizam a necessidade de desenvolvimento de inibidores que sejam capazes de inibir as duas desidratases de forma simultânea, já que as duas enzimas dependem da mesma subunidade catalítica, HadB (GRZEGORZEWICZ et al., 2020).

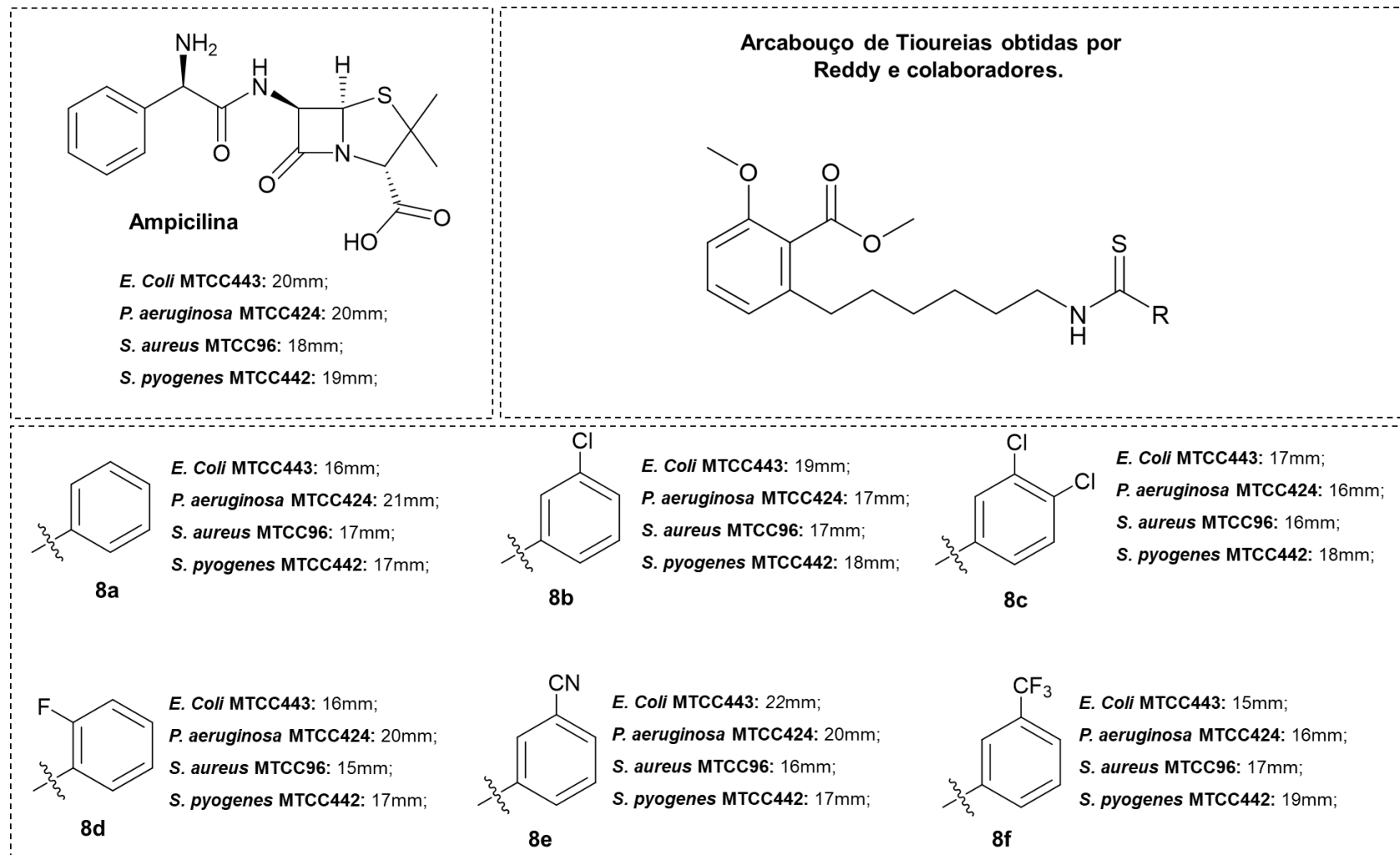
A partir das observações realizadas, é possível estabelecer uma relação benéfica derivada de uma possível inibição desta enzima. Uma vez que sua participação ocorre em uma etapa crucial do processo de biossíntese de ácidos micólicos conforme exposto anteriormente. Somado aos mecanismos de ação elencados para o **ISO**, e considerando os aspectos estruturais do *Mtb* destacados anteriormente e a importância dos ácidos micólicos para a constituição da parede celular e camada serosa, o efeito inibitório produzido a partir da ação do **ISO** e seus derivados pode ser determinante em definir um possível efeito antimicobacteriano.

1.2.3 Tioureias: Classe Promissora Na Pesquisa De Fármacos Anti-TB.

Apesar de suas limitações e desvantagens, o **ISO** apresenta-se como um arcabouço importante no desenvolvimento de novos fármacos para TB, uma vez que é possível contorná-las por meio do planejamento de outros derivados de tioureia, que podem exibir incrementos de atividade biológica e em parâmetros físico-químicos, por meio de alterações estruturais importantes.

Neste contexto, pode-se citar alguns derivados de tioureia que exibem largo espectro de atividade já conhecido contra infecções bacterianas. Reddy e colaboradores em 2011 propuseram a avaliação da atividade antibacteriana de derivados de ureia e tioureia frente a cepas de *E. coli* (MTCC443), *P. aeruginosa* (MTCC424), *S. aureus* (MTCC96) e *S. pyogenes* (MTCC443). O método para avaliação considerou um protocolo de difusão em ágar-meio utilizando-se discos impregnados com os análogos a uma concentração de 250 µg/mL posteriormente tiveram seus halos de inibição interpretados comparando-se com ampicilina (REDDY et al., 2011). As observações podem ser resumidas na **Figura 12**.

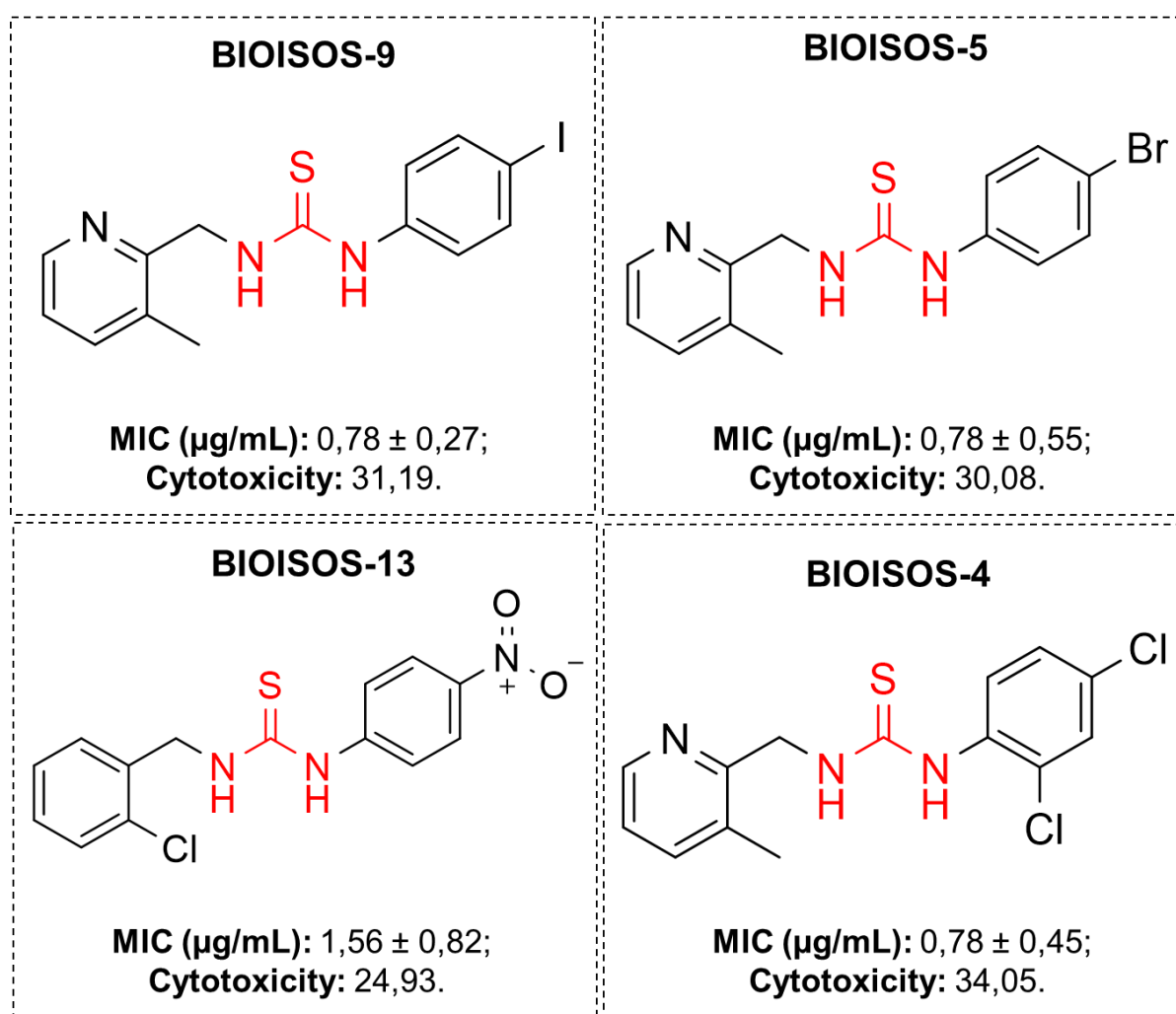
Figura 12. Estruturas de tioureias avaliadas por Reddy e colaboradores.



Fonte: Próprio autor. As substâncias relacionadas no estudo foram testadas por meio de disco para difusão em ágar-meio. A concentração aplicada foi de 250 µg/mL sendo comparadas com a Ampicilina. Os resultados foram expressos em mm que representa o diâmetro do halo de inibição exibido pelos discos.

No contexto de alternativas anti-TB, Prati e colaboradores (2018) identificaram um importante derivado de ureia que possui propriedades favoráveis que representam uma importante alternativa frente ao *Mtb*, contudo, apresentava baixa atividade inibitória. A partir disso, pelo emprego da técnica de bioisosterismo, Dogan e colaboradores propuseram derivados de que consistiam primordialmente na troca do grupo ureia para tioureia, variação do tamanho de cadeias alquila e alterações em anéis da estrutura. Pelo menos quatro derivados (compostos **Bioisos-4**, **Bioisos-5**, **Bioisos-9** e **Bioisos-13**, **Figura 13**) exibiram atividade com CIM $\leq 1,56 \mu\text{g/mL}$, mais ativos até que o **EMB**, droga de primeira linha no combate à TB (PRATI et al., 2018; PYM; SAINT-JOANIS; COLE, 2002).

Figura 13. Estruturas dos compostos **Bioisos-4**, **Bioisos-5**, **Bioisos-9** e **Bioisos-13** obtidas pela técnica de bioisosterismo empregada por Dogan e colaboradores.



Fonte: Adaptado de MILANI et al., 2024.

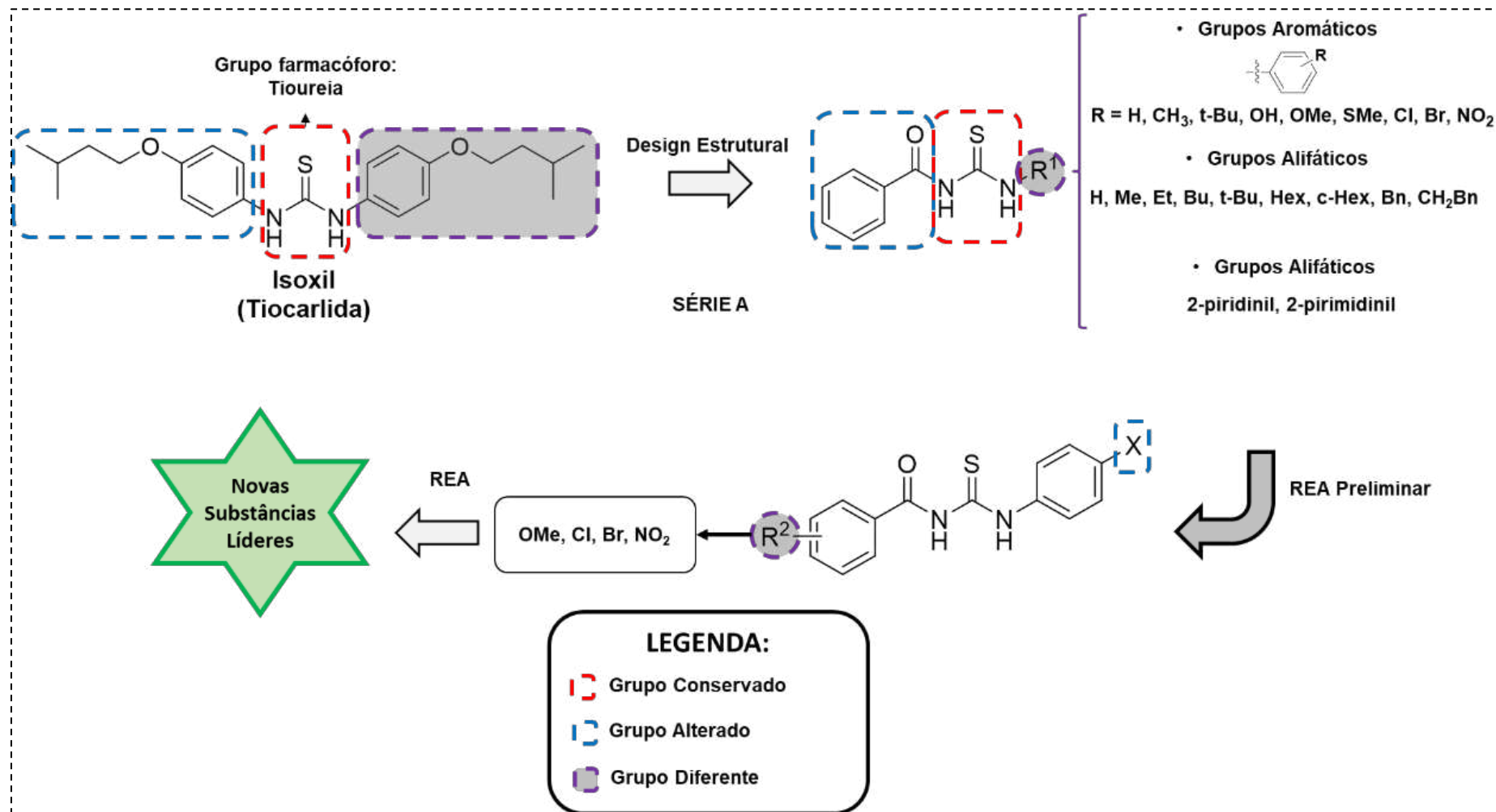
Tais achados revelam-se importantes indícios para confirmação da alternativa baseada em derivados contendo função tiourea, como importantes espécies a serem consideradas no contexto de desenvolvimento de análogos importantes frente ao *Mtb*.

1.2.3.1 Tioureas presentes na quimioteca do LasMMed.

Partindo das informações discutidas anteriormente e do potencial arcabouço estrutural representado pelo **ISO**, um estudo de Relação Estrutura-Atividade (REA, ou do inglês *Structure-Activity Relationship, SAR*) foi conduzido anteriormente por Brito e colaboradores (2020) originando a quimioteca de benzoiltioureas do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LasMMed) da Universidade Estadual de Londrina (BRITO et al., 2020).

Neste estudo, 99 (noventa e nove) derivados de benzoiltioureas foram obtidos seguindo-se um conceito originado do arcabouço estrutural de **ISO**. As estruturas baseavam-se na conservação da função do núcleo de tiourea, grupo farmacóforo conhecido e discutido anteriormente. Primeiramente, o grupo 4-isopentiloxi fenila foi substituído por um grupo contendo núcleo benzoíla com o objetivo de melhorar a característica de hidrossolubilidade dos compostos a serem sintetizados. Em seguida, o outro grupo 4-isopentiloxi fenila foi substituído por agrupamentos aromáticos, alifáticos e heteroaromáticos (**Figura 14**) (BRITO et al., 2020).

Figura 14. Planejamento empregado para o desenvolvimento das estruturas de benzoiltioureas da quimioteca.



Fonte: Adaptado de BRITO et al., 2020.

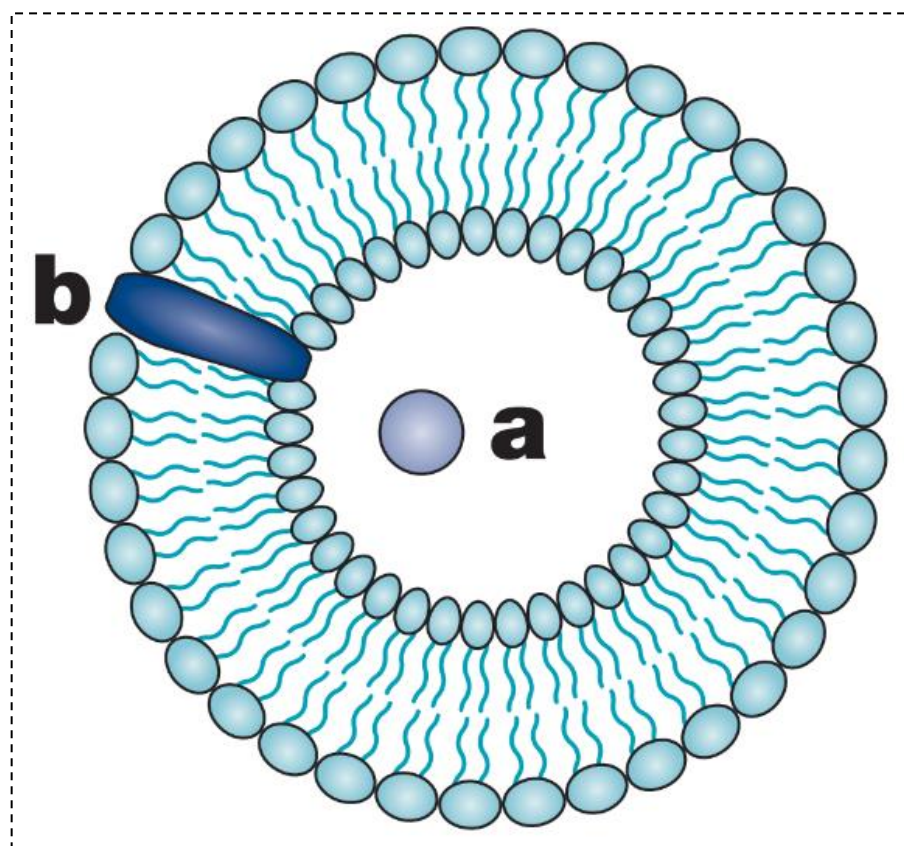
Apesar das alterações estruturais e alinhado com o que foi descrito em literatura para o **ISO**, algumas benzoiltioureas obtidas por Brito e colaboradores apresentaram aumento de lipofilicidade alinhado também com um aumento da atividade antimicrobiana. Contudo, a lipofilicidade pode impactar negativamente na execução de ensaios de MIC já que o meio empregado em testes convencionais tem característica aquosa. Diante disso, alternativas que supram a necessidade frente à solubilidade tornam-se desejáveis por melhorarem a entrega do ligante mesmo dentro de meios com característica desfavorável para solubilidade dos fármacos.

1.3 LIPOSSOMAS COMO ALTERNATIVA PARA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS

Diversas propriedades farmacológicas dos fármacos “livres” convencionais podem ser suplantadas com a utilização de sistemas de liberação de fármacos (ou do inglês, *Drug Delivery Systems, DDS*). Esses sistemas podem incluir partículas carreadoras, polímeros, lipídeos, entre outros, que auxiliam na veiculação de fármacos que possuem características intrínsecas indesejáveis, como solubilidade, estabilidade, entre outras, frente ao uso requerido. Os sistemas de liberação podem agir alterando aspectos farmacocinéticos e de biodisponibilidade dos fármacos associados ou até mesmo, funcionando como reservatórios para liberação prolongada (ALLEN; CULLIS, 2004; LOMBARDO; KISELEV, 2022a).

Dentro destes sistemas pode-se destacar o papel dos *lipossomas*, que se trata de nanopartículas compostas primordialmente por lipídeos que encapsulam compostos ativos, hidrofílicos ou lipofílicos, formando nanovesículas que aprisionam o fármaco e carregam dentro de um meio proposto. Dentre as principais vantagens exibidas na utilização de um sistema tal qual o lipossoma pode-se destacar a habilidade de veicular compostos insolúveis favorecendo sua solubilização e, também, a proteção contra agentes químicos e biológicos (LOMBARDO; KISELEV, 2022b).

Figura 15. Modelo de estrutura básica da nanoestrutura formada no lipossoma.



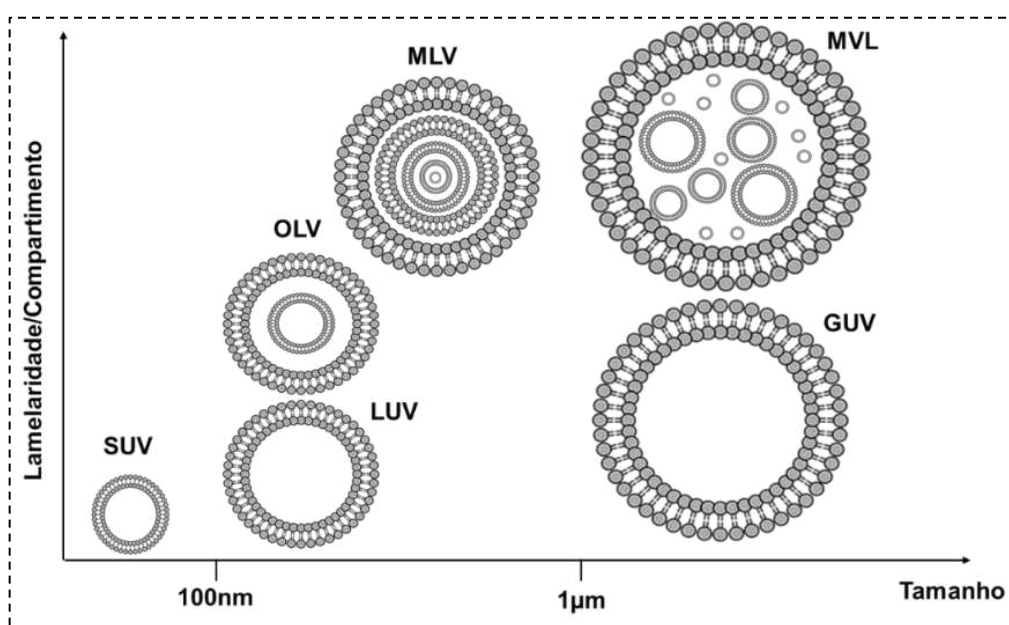
Fonte: Adaptado de TORCHILIN, 2005. *Estrutura básica do lipossoma que consiste na formação de uma bicamada lipídica. A disposição da droga depende de sua característica, em que a) indica a disposição de drogas hidrossolúveis, enquanto que b) indica a disposição de drogas lipossolúveis.*

As estruturas assumidas pelas vesículas em nanoemulsões como o lipossoma podem variar com o método de preparo empregado bem como o lipídeo utilizado. Essa variação da estrutura formada pela vesícula origina diferentes tipos e categorias da formulação. Os lipossomas podem ser classificados como Vesículas Unilamelares (ULVs), Vesículas Oligolamelares (OLVs), Vesículas Multilamelares (MLVs) e Lipossomas Multivesiculares (MVLs). Os lipossomas classificados como OLVs e MLVs apresentam uma estrutura similar à “cebola”, devido as múltiplas camadas que possuem. As diferenças entre os tipos lipossomas podem ser divididas baseado no número de camadas que podem constituir. Os OLVs apresentam, usualmente, entre duas a cinco camadas lipídicas, enquanto os MLVs apresentam número de camadas superiores a cinco. Os lipossomas do tipo MVL são estruturados por inúmeros compartimentos unidos por uma única bicamada lipídica como uma estrutura semelhante a um “favo de mel” (LIU; CHEN; ZHANG, 2022; NSAIRAT et al., 2022; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015; WANG; CHEN; WANG, 2019).

Os tamanhos podem variar entre os tipos de lipossomas ULVs que podem ser formado. Basicamente podem ser divididos em três subcategorias como, SUVs (do inglês, *Small Unilamellar Vesicles*) possuindo tamanho variável de 30 a 100 nm, LUVs (do inglês, *Large Unilamellar Vesicles*) possuindo tamanho, também variável, acima de 100 nm e, por fim, GUVs (do inglês, *Giant Unilamellar Vesicles*) com tamanhos acima de 1000 nm (WANG; CHEN; WANG, 2019).

Diversos métodos de preparo tem sido desenvolvidos para a obtenção de lipossomas conforme suas aplicações. O método mais comumente empregado é baseado na hidratação do filme lipídico. Esse método consiste em evaporar uma fração de solvente orgânica que solubiliza e veicula uma mistura de lipídeos que se deseja aplicar, em um rota-evaporador a vácuo. A evaporação do solvente orgânico leva à formação de uma fina camada de lipídeos depositados regularmente no recipiente de preparo (LIU; CHEN; ZHANG, 2022). Após a evaporação do solvente, hidrata-se o filme com a adição de uma solução aquosa. Como exemplo dessa preparação temos os fármacos Visudyne, AmBisome e Shingrix (ADLER-MOORE; GAMBLE; PROFITT, 1999; CHEPLAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH, 2000; CLAUDE GARCON; FRIEDE, 2005).

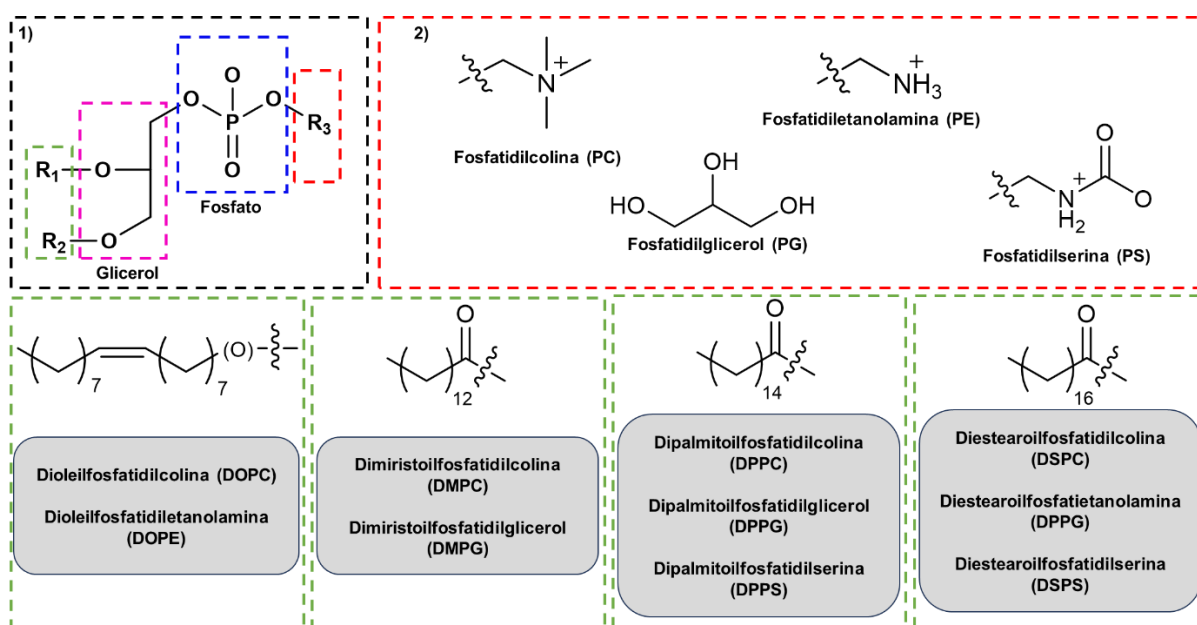
Figura 16. Organização da bicamada lipídica entre os tipos de lipossomas.



Fonte: Adaptado de LIU, P. et al., 2022. São mostrados na figura a organização das camadas. A diferença entre o MVL e o MLV fica mais evidente atentando-se a ilustração, já que os compartimentos mencionados anteriormente ficam mais destacados e seu modo de organização e distribuição tornam-se mais claros.

Os lipossomas podem ser construídos a partir de diversos tipos de fosfolipídicos de característica anfifílica associados a outros lipídios como o Colesterol, por exemplo, que auxilia na estabilidade da bicamada lipídica. Os fosfolipídeos nesse contexto desempenham um papel importante sobre o aspecto de formação da estrutura da vesícula, bem como um papel fundamental na manutenção de propriedades da superfície vesicular. As bicamadas lipídicas podem apresentar-se de forma “rígida” ou “fluida” que é atribuída principalmente à categoria do fosfolipídio empregado e ao tamanho da cadeia carbônica e seu grau de saturação (WANG; CHEN; WANG, 2019).

Figura 17. Exemplos de fosfolipídeos empregados no preparo de lipossomas.



Fonte: Próprio autor adaptado de BATISTA et al., 2007. As estruturas podem ser visualizadas separadas em quadros identificados. Em verde observa-se as cadeias de ácidos graxos que podem preencher R₁ e R₂. Em vermelho, os grupos funcionais (R₃) que podem encontrar-se ligados ao grupo fosfato.

Diante das propriedades físico-químicas conhecidas para as benzoiltioureias, é possível compreender uma possível adversidade a ser enfrentada para os testes *in vitro* uma vez que os meios empregados durante os testes conhecidos consistem em meios aquosos. A estrutura do lipossoma, portanto, apresenta-se como uma alternativa viável para o emprego de técnicas de avaliação *in vitro* já que sua estrutura viabiliza a dispersão de moléculas hidrofóbicas em meio aquoso, predominante em modelos de teste *in vitro*.

2 OBJETIVOS

Selecionar derivados de tioureia como potenciais inibidores da enzima (3*R*)-hidroxilacil-ACP desidratase (HadAB) de *Mycobacterium tuberculosis* por meio de triagem virtual baseada em *docagem* molecular, assim como avaliar *in silico* as suas propriedades físico-químicas e de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET), para, finalmente, avaliar as suas atividades antimicobacterianas *in vitro*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

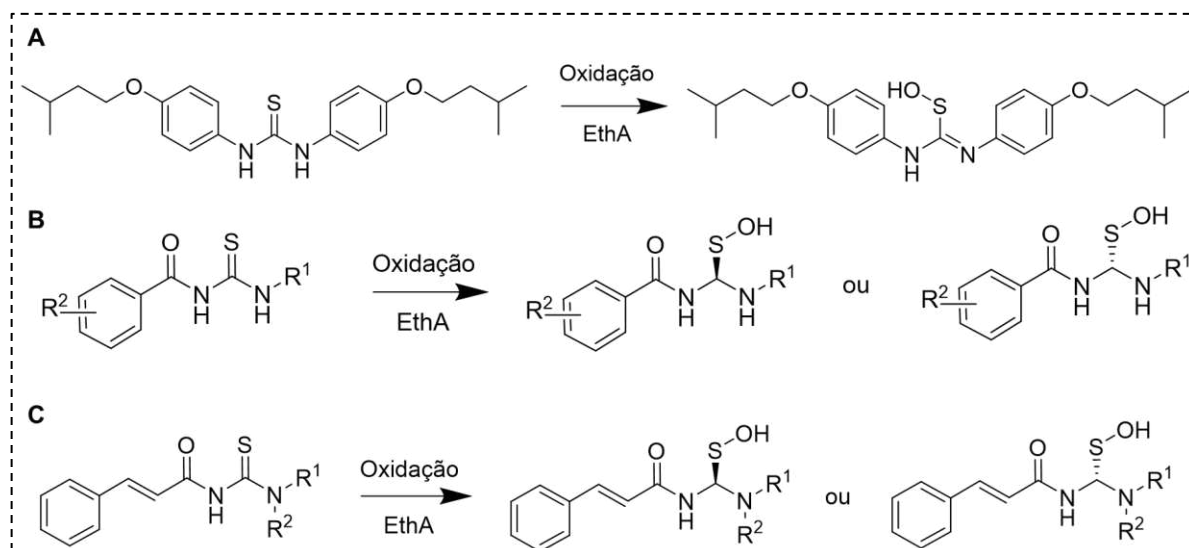
- ✓ Realizar triagem virtual baseada em *docagem* molecular para identificar possíveis inibidores da HadAB:
 - Estabelecer e validar o protocolo de *docagem* molecular;
 - Analisar as interações proteína-ligante;
- ✓ Realizar a predição *in silico* das propriedades de *fármaco-similaridade*, relacionadas à absorção oral e biodisponibilidade, a fim de identificar os análogos mais promissores;
- ✓ Selecionar as melhores substâncias para avaliação *in vitro* frente ao *Mtb*.
 - Construção e caracterização dos lipossomas para veiculação em testes *in vitro*;
 - Realização de testes de MIC para avaliação da atividade das benzoiltioureias selecionadas pela avaliação *in silico* e encapsuladas pelos lipossomas propostos no estudo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENHO DE TIOUREIAS COM POTENCIAL ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA (3R)-HIDROXILACIL-ACP-DESIDRATASE (MTBHADAB)

É sabido que o ISO é um pró-fármaco. Logo, para se tornar ativo, deve sofrer uma oxidação no enxofre da tioureia levando à formação do ácido sulfênico correspondente (GRZEGORZEWICZ et al., 2015a; KORDULÁKOVÁ et al., 2007; PHETSUKSIRI et al., 1999c). Essa oxidação é mediada pela enzima micobacteriana EthA monoxigenase, como representado na **Figura 18A**. Como os ligantes de interesse desse trabalho também contêm o grupamento tioureia, assumiu-se que tais substâncias também passariam pelo mesmo processo de oxidação, gerando seus ácidos sulfênicos correspondentes como formas ativas.

Figura 18. Padrões de oxidação esperados para as tioureias ISO, benzoiltioureias e tioureias derivadas do ácido cinâmico.



Fonte: Próprio autor. O padrão de oxidação do grupamento tioureia relatado para o ISO (A), o arcabouço base para obtenção dos derivados de benzoiltiouréias do estudo. O C da tioureia exibe natureza pró-quiral, quando os agrupamentos anexos (R₁ e R₂) diferirem entre si, uma vez que com a oxidação do enxofre para formação do ácido sulfênico correspondente ocorre uma quebra da dupla ligação conforme observado. (B) representa o padrão de oxidação observado para benzoiltioureias e (C) representa o padrão de oxidação para tioureias derivadas do ácido cinâmico.

No caso do ISO, a quebra da dupla ligação, decorrente da oxidação do enxofre, não produz estereoisômeros por se tratar de uma molécula simétrica. No entanto, os ligantes em análise (**Figura 18B**) são benzoiltiouréias e, portanto, não possuem tal simetria e, desta forma, a oxidação da tioureia, levaria a formação de uma

mistura de enantiômeros de configuração *R* e *S*. Tendo em vista a característica pró-quiral da tiocarbonila durante a conversão para ácido sulfênico, ambas as configurações de cada ácido sulfênico foi avaliada na triagem virtual, gerando um total de duas estruturas pelo menos, para cada ligante (**1 a 99**, Apêndice A).

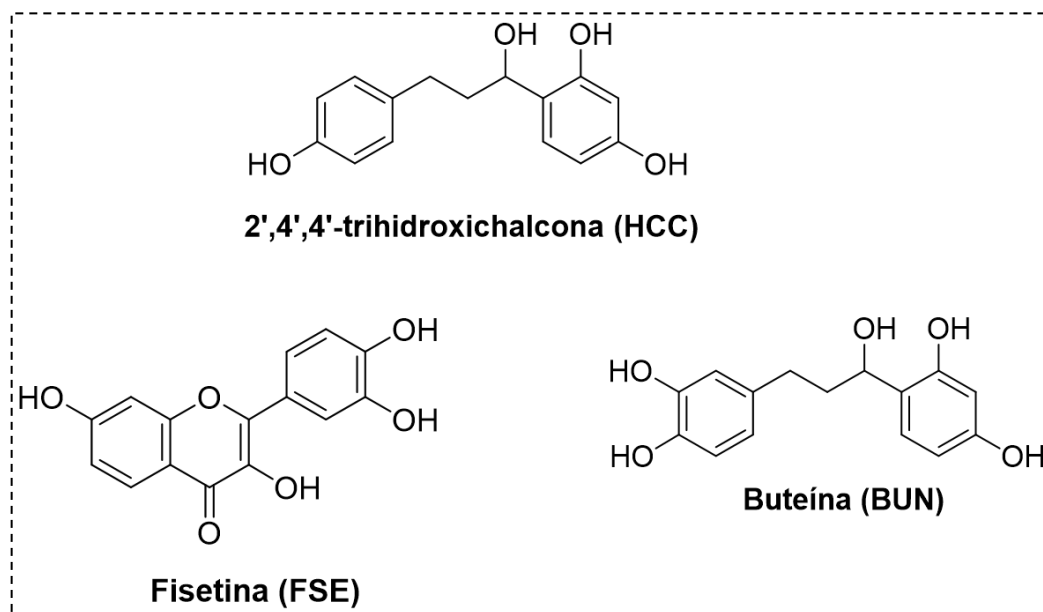
Alguns ligantes da quimioteca são bisbenzoiltiouréias, ou seja, apresentam dois centros pró-quirais, pois os dois grupamentos tioureia poderiam ser oxidados. Para estes casos, observou-se a possibilidade da formação de diastereoisômeros de configuração (*R,R*),(*R,S*) e (*S,S*), levando mais 2 estruturas a serem consideradas na triagem (**4 e 6**).

Ao total, os estereoisômeros das 95 benzoiltioureias de interesse tiveram suas estruturas 2D desenhadas, totalizando 200 estruturas (**1 a 99**, Apêndice A). Em seguida, foi realizada a checagem dos tautômeros e o estado de protonação dessas estruturas predominantes em pH fisiológico (7,4), mostrando que não houve alterações nas estruturas em relação a esses parâmetros no pH avaliado.

3.2 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE DOCAGEM MOLECULAR

A procura por um modelo do complexo no *Protein Data Bank* (PDB) retornou o estudo descrito por Dong e colaboradores (2015), que descrevem os aspectos estruturais e bases moleculares do complexo HadAB. Neste estudo, os complexos foram elucidados e depositados sob os códigos 4RLT, 4RLU e 4RLW, sendo eles correspondentes ao alvo *MtbHadAB* complexado com três inibidores diferentes: fisetina (**FSE**), 2',4',4'-trihidroxichalcona (**HCC**) e buteína (**BUN**) respectivamente, que são importantes flavonóides de atividade antimicobacteriana conhecida (**Figura 19**). Assim como o **ISO**, os flavonóides mencionados nesse estudo estão relacionados a inibição da mesma etapa de alongamento dos AM intermediada pelo ciclo FAS-II anteriormente relatado, sinalizando uma semelhança em aspectos moleculares.

Figura 19. Estruturas moleculares dos ligantes **FSE**, **HCC** e **BUN**.

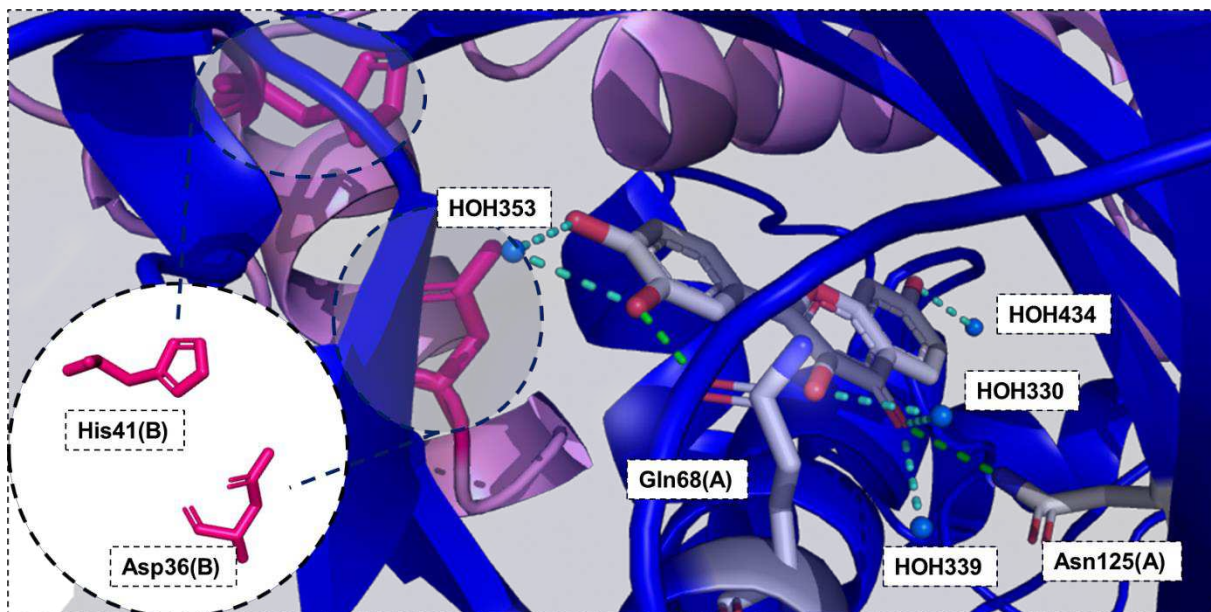


Fonte: Próprio autor. *Flavonóides mencionados no estudo de Dong e colaboradores que originaram os complexos 4RLT (FSE), 4RLU (HCC) e 4RLW (BUN). Os ligantes ilustrados acima encontram-se co-cristalizados com cada complexo mencionado respectivamente.*

A escolha entre os complexos se deu baseada nos dados informados para a validação dos arquivos obtidos e a análise da qualidade estrutura do ligante obtida. Esses parâmetros foram escolhidos para filtro pois, em termos de resolução, os três complexos não apresentam valores muito discrepantes, revelando uma qualidade de acurácia no complexo homogênea para os arquivos obtidos no estudo. No entanto, conforme o objetivo do presente estudo, uma melhor filtragem dos aspectos estruturais do ligante complexado poderia incrementar a acurácia das predições realizadas. Dentre os três complexos, o 4RLT (Resolução 2,05Å) foi selecionado para o presente estudo.

As evidências expostas por Dong e colaboradores contribuem enormemente no sentido de estabelecer a possível influência de resíduos de água na estabilidade do ligante co-cristalizado, porém, o trabalho de Dong não explicita claramente os resíduos específicos no complexo 4RLT. Investigações foram necessárias para definir as águas mais próximas originando as observações de interação que podem ser verificadas na **Figura 20**.

Figura 20. Interações do ligante **FSE** com moléculas de água e resíduos próximos no complexo 4RLT.



Fonte: Próprio autor adaptado de Dong et al., 2015. As possíveis interações com moléculas de água podem ser verificadas pela coloração azul claro nas linhas tracejadas. As ligações de hidrogênio são representadas em traços verdes, envolvendo os resíduos Asn125(A) e Gln68(A). Destacado no círculo disposto no canto inferior da figura, estão os resíduos que compõe a tríade catalítica, que encontra-se próximo à região de interação do ligante **FSE**.

Ainda podemos destacar uma proximidade possivelmente importante de pelo menos quatro moléculas de água na região sendo **HOH353**, **HOH330**, **HOH339** e **HOH434**. A **FSE** apresenta em sua estrutura átomos de oxigênio, como O4, O3 e O7 que interagem com moléculas de solvente presente na região. Além disso, ligações de hidrogênio são formadas entre os átomos O4 e O3 do ligante e cadeias laterais de Asn125 (A) e Gln68 (A). Ou seja, evidencia-se que existam interações relevantes da **FSE** com a água, já que o solvente do meio considerado se trata de um meio aquoso. Essas moléculas de água que interagem, ainda, possuem uma grande proximidade com a tríade catalítica. Destas quatro, podemos verificar pelo diagrama exposto anteriormente as possíveis interações encontradas no modelo cristalográfico do complexo 4RLT (DONG et al., 2015b, 2015c).

Diante disso, foram testados protocolos de validação para o docking molecular, com as águas rígidas, com diferentes distâncias de interação e com as águas flexíveis, a fim de se investigar qual protocolo seria capaz de reproduzir de forma mais aproximada ao modelo real. Os resultados obtidos para a redocagem considerando as águas como rígidas, estão apresentados na **Tabela 1**.

Desta forma, após análises preliminares dos valores de RMSD, pôde-

se observar que todas as funções de pontuação apresentaram complexos com valores abaixo de 2,00 Å, com destaque para as funções GoldScore e CHEMPLP que obtiveram 7 e 4 poses validadas, respectivamente. Considerando tais evidências, poderiam ser utilizadas todas as quatro funções para análise do alvo molecular e seus ligantes candidatos. É importante notar que dentre as quatro poses com RMSD < 2,0 Å para a função CHEMPLP, todas apresentaram os maiores valores de FS (68,91-66,83), indicando que além da reprodução da pose experimental, o ajuste do espacial do ligante também está sendo reproduzido. O mesmo pode ser observado para as soluções da função GoldScore, que dentre as sete que apresentaram valores de RMSD < 2,0 Å, cinco apresentaram elevados valores de FS (58,61-57,86).

Tabela 1. Valores de RMSD e Fitness Score (FS) obtidos para as 10 corridas em cada função de pontuação analisada, na presença das moléculas de água selecionadas, consideradas rígidas.

Soluções	CHEMPLP		ASP		GoldScore		ChemScore	
	RMSD (Å)	FS	RMSD (Å)	FS	RMSD (Å)	FS	RMSD (Å)	FS
1	1,74	68,73	5,42	36,57	0,35	58,09	8,75	21,70
2	4,99	66,36	5,25	37,51	1,89	57,86	0,40	25,56
3	5,50	66,68	5,30	37,51	2,11	56,93	5,18	24,32
4	5,11	66,18	5,82	36,12	5,27	54,89	5,01	23,03
5	1,78	66,84	1,56	38,17	1,11	55,03	4,85	24,40
6	5,01	66,27	5,54	37,32	1,71	58,58	5,45	25,63
7	0,36	67,85	5,31	38,16	2,05	57,22	5,43	25,41
8	1,58	68,91	5,45	37,38	1,64	58,33	1,82	26,09
9	8,09	56,89	5,34	38,75	0,26	55,85	5,42	25,46
10	8,82	58,08	5,40	38,21	1,69	58,62	5,18	26,39

Fonte: Próprio autor. Destacado em azul os valores de RMSD menores que 2,00 Å.

Tal observação pode sustentar a importância das águas no reconhecimento do alvo molecular, ou seja, as águas HOH353, HOH330, HOH339 e HOH434 interagem com a **FSE** e resíduos de aminoácido próximos podendo incrementar a complementariedade do ligante ao sítio de ligação. Além disso, alguns autores consideram que a modulação e configuração de águas na docagem molecular, utilizando-se o GOLD, pode aumentar a acurácia do modelo de predição de interações ligante-receptor (VERDONK et al., 2005).

Com o objetivo de aproximar-se de um modelo otimizado e factível para o complexo em análise e, ainda, considerando-se que a função de pontuação de melhor desempenho no docagem com água fixa foi a GoldScore, realizou-se outras

três validações por redocagem, na função de pontuação GoldScore, utilizando-se condições distintas para as águas a fim de observar se haveria diferença nos valores de RMSD obtidos, visando definir as melhores condições de estudo para os ligantes da quimioteca. Na primeira redocagem foi considerada a ausência das águas, na segunda, utilizou-se uma distância de interação das águas de 1 Å (VERDONK et al., 2005) e, na terceira, utilizou-se uma distância de 2 Å. Após a realização das três redocagens, foi possível obter os resultados listados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Resultados de Fitness Score (FS) e RMSD para as três condições de redocagem na função GoldScore.

Soluções	Águas Ausentes		Águas (1 Å)		Águas (2 Å)	
	RMSD (Å)	FS	RMSD (Å)	FS	RMSD (Å)	FS
1	3,41	54,07	2,62	56,38	3,18	58,53
2	2,73	52,94	2,70	55,69	3,18	60,50
3	2,14	54,95	5,21	56,18	1,92	62,05
4	2,11	55,96	3,61	56,80	3,27	61,18
5	3,20	54,65	0,36	58,71	3,29	59,10
6	1,94	55,50	3,17	56,33	2,01	58,54
7	2,12	56,06	2,80	55,40	3,23	58,95
8	1,99	56,12	2,25	57,04	2,10	60,95
9	2,08	56,02	0,64	60,72	1,90	62,87
10	3,59	52,56	2,45	57,33	3,27	59,66

Fonte: Próprio autor.

Atentando-se aos resultados de RMSD obtidos para as análises realizadas, pode-se considerar que em todas as três condições foi possível a obtenção de complexos com RMSD < 2,00 Å. No entanto, quando consideramos a magnitude dos valores de RMSD, observamos que os valores dos complexos validados para a redocagem com água configurada na distância de 2 Å (sol. 9 e 3) estão muito próximos dos complexos validados no redocagem realizado na ausência de água (sol. 8 e 6). Vale ainda salientar que tais complexos validados apresentaram ainda valores muito limítrofes se considerarmos o valor de aceitável para validação (RMSD < 2,00 Å). Para os complexos validados no redocagem com água configurada na distância de 1 Å, observou-se que os valores de RMSD dos complexos validados (sol. 5 e 9) foram muito abaixo de 2 Å. Além disso, essas duas soluções ainda apresentaram os maiores valores de FS dentre as demais, indicando que além de conseguir reproduzir a pose experimental, esse protocolo foi capaz de maximizar as interações com o sítio de

ligação.

A fim de verificar a influência desta configuração em outras funções de pontuação e confirmar a utilização da função GoldScore, realizou-se também um redocagem nas condições escolhidas (águas flexíveis a 1 Å) em todas as funções implementadas no GOLD (**Tabela 3**).

Tabela 3. Valores de RMSD e Fitness Score (FS) obtidos para a condição de água configurada em 1 Å para as quatro funções de pontuação.

Soluções	CHEMPLP		ASP		ChemScore		GoldScore	
	RMSD (Å)	FS	RMSD (Å)	FS	RMSD (Å)	FS	RMSD (Å)	FS
1	7,42	73,28	5,28	37,72	8,08	31,38	2,62	56,38
2	1,75	81,54	5,63	37,45	7,69	29,44	2,70	55,69
3	4,91	81,11	4,96	37,16	5,08	31,03	5,21	56,18
4	4,86	80,76	4,99	37,73	5,00	31,84	3,61	56,80
5	7,93	76,01	5,29	37,48	4,93	31,24	0,36	58,71
6	4,84	79,95	5,30	37,00	5,27	30,67	3,17	56,33
7	5,03	79,33	8,57	34,55	5,05	28,49	2,80	55,40
8	5,00	79,54	5,00	29,87	5,47	28,95	2,25	57,04
9	1,76	82,20	5,06	37,52	4,91	29,56	0,64	60,72
10	5,06	79,75	5,11	36,86	8,13	30,70	2,45	57,33

Fonte: Próprio autor.

O emprego de águas flexíveis foi capaz de reduzir drasticamente a quantidade de complexos validados, conforme observado pela mudança abrupta no padrão de valores de RMSD. Desta forma, apenas duas funções de pontuação poderiam ser adequadas para o estudo: ChemPLP e GoldScore. A função ChemPLP foi capaz de reproduzir de forma satisfatória o complexo 2 (RMSD = 1,75 Å) e complexo 9 (RMSD = 1,76 Å), ambos os valores abaixo de 2,00 Å. No entanto, a função GoldScore, além de apresentar igualmente dois complexos com valores de RMSD adequados, exibiu valores menores do que aqueles observados para a função ChemPLP (sol. 5 - RMSD = 0,36 Å e sol. 9 - RMSD = 0,64 Å), sinalizando uma acurácia maior no ajuste do ligante avaliado em relação ao ligante de referência.

Ao ajustar as águas no modelo para redocagem, suspeitou-se da influência das configurações das águas nas poses experimentais a serem previstas nas corridas. Portanto, para avaliar esse fator, foram realizadas quatro corridas, em função GoldScore, para obtenção dos dados referentes às diferentes configurações possíveis da água no alvo molecular. Constituindo um padrão de comparação, duas corridas

foram realizadas como controle. Uma considerou o complexo 4RLT obtido diretamente do *PDB* e a outra a partir do 4RLT editado, em que foram excluídas as águas do modelo deixando-se somente as **HOH353**, **HOH330**, **HOH339** e **HOH434**. Partindo-se do pressuposto de que a única mudança realizada se centrou em águas não relacionadas ao sítio ativo, diferenças nas poses experimentais do FSE não deveriam ser observadas nas corridas, retornando um RMSD entre a FSE extraída dos dois complexos de 0,00 Å.

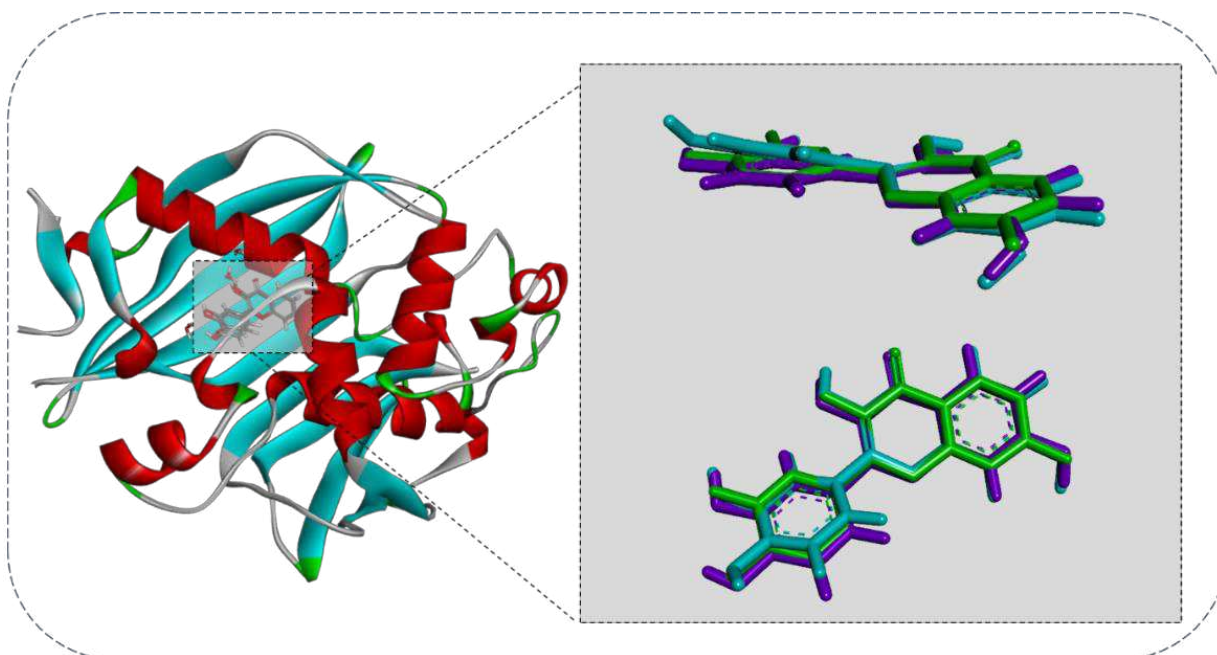
Tabela 4. Sobreposição dos ligantes extraídos em complexos considerando ligante tratado, água flexível, água fixa comparadas com o ligante bruto.

	4RLT-FSE1	4RLT-FSEHOH	4RLT-FSEHOH-FXD	4RLT-FSEHOH-FLX	RMSD (Å)
1	4RLT-FSE1	X	-	-	0,00
2	4RLT-FSE1	-	X	-	0,00
3	4RLT-FSE1	-	-	X	0,26
4	4RLT-FSE1	-	-	-	0,36
6	4RLT-FSEHOH	-	X	-	0,00
7	4RLT-FSEHOH	-	-	X	0,26
8	4RLT-FSEHOH	-	-	-	0,36
9	4RLT-FSEHOH-FXD	-	-	X	0,00
10	4RLT-FSEHOH-FXD	-	-	-	0,37
11	4RLT-FSEHOH-FLX	-	-	-	0,00

Fonte: Próprio autor. *Legenda para as siglas: 4RLT-FSE1 se trata do ligante FSE extraído diretamente do complexo obtido do pdb; 4RLT-FSEHOH é o ligante FSE extraído do complexo contendo apenas as águas catalíticas; 4RLT-FSHOH-FXD ligante extraído do complexo após corrida em GoldScore com parâmetro de águas fixas e 4RLT-FSEHOH-FLX é o ligante extraído do complexo após corrida em GoldScore com parâmetro de águas flexíveis.*

A presença de água e suas configurações na redocagem, podem influenciar no grau de liberdade do ligante em seu ajuste no alvo molecular. Devido a tal influência, pode-se observar diferentes ajustes espaciais do mesmo ligante considerando sua flexibilidade em cada caso avaliado durante a validação. Neste contexto, a comparação dos complexos por sobreposição foi informativa o suficiente para elucidar o comportamento em relação ao ligante de referência e, também, comparados com os demais complexos avaliados no ajuste da validação.

Figura 21. Alvo molecular com a sobreposição em zoom dos complexos obtidos nas configurações de água mencionadas.



Fonte: Próprio autor. As estruturas em comparação podem ser verificadas pelas sobreposições acima. As estruturas sobrepostas na região cinza condizem com a ampliação da zona destacada no alvo molecular ao lado, conforme indicação da linha tracejada. Em **verde** destaca-se o 4RLT-FSEHOH, sendo o complexo original com apenas as águas HOH353, HOH330, HOH339 e HOH434 conservadas. Em **roxo** observa-se o ligante com 4RLT-FSEHOH-FXD e, por fim, em **ciano** o ligante 4RLT-FSEHOH-FLX com águas reguladas conforme discutido anteriormente. Como o ligante em verde se trata do 4RLT-FSE com exclusão das águas não relevantes para o alvo molecular, não é possível observar o 4RLT-FSE1 na sobreposição pois, estão superpostos.

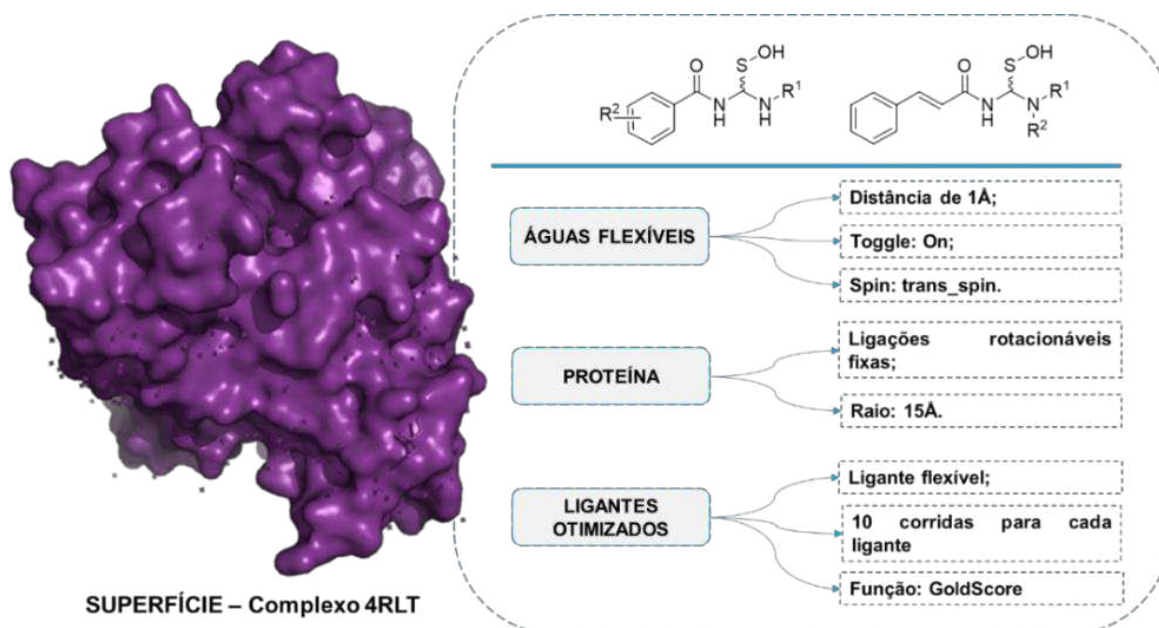
Diferenças não foram observadas entre o **4RLT-FSEHOH** e o **4RLT-FSE1** (RMSD 0,00 Å) uma vez que se trata do mesmo ligante, com as mesmas configurações, diferindo apenas a origem do complexo que foram extraídos. O **4RLT-FSE1** foi retirado diretamente do complexo 4RLT enquanto, o **4RLT-FSEHOH**, foi retirado do complexo 4RLT apenas com as águas HOH353, HOH330, HOH339 e HOH434. Como não foram realizadas alterações que pudessem culminar em diferenças no ajuste do ligante, a superposição observada, e confirmada pelo RMSD exibido, era esperada. Os demais valores de RMSD 0,00 Å se referem à comparação de cada ligante em relação a ele mesmo.

O ligante extraído do complexo originado da corrida com água flexível exibiu o RMSD de 0,36 Å. Isso foi observado duas vezes pois, como referência, houve a comparação com o **4RLT-FSE1** e do **4RLT-FSEHOH** que, conforme discutido anteriormente, exibem o mesmo comportamento conformacional. Importante ressaltar que o valor exibido foi o mesmo obtido na corrida que originou o complexo, estando

conforme a validação nos parâmetros de água flexível. A mesma característica pode ser considerada também para comparação do ligante extraído complexo de água fixa **4RLT-FSEHOH-FXD**, com valor de RMSD de 0,26 Å e que ocorreu, também, duas vezes nas comparações realizadas, estando condizente com a validação realizada conforme águas fixas.

O único valor diferente dos demais refere-se à comparação entre o **4RLT-FSEHOH-FXD** e o ligante extraído do complexo de água flexível **4RLT-FSEHOH-FLX** com RMSD de 0,37 Å. O valor de RMSD exibido sugere que existe diferença entre a comparação dos dois complexos. Contudo, como o valor encontra-se abaixo do valor de corte 2,00 Å, sugere-se que apesar da diferença, ela não aparenta ser significativa de modo a comprometer a análise a partir dos complexos obtidos nas condições estudadas no protocolo de docagem molecular executado. No entanto, sinaliza que a diferença do posicionamento da água pode influenciar na pose do ligante que confirma o papel da água como um ponto de ancoragem importante do ponto de vista de relação alvo-ligante. Portanto, o protocolo usando a função GoldScore com as águas flexíveis na distância de 1 Å foi devidamente validado por redocagem e, portanto, escolhido para ser utilizado na triagem virtual baseada em docagem molecular dos derivados de tioureia de interesse (**Figura 22**).

Figura 22. Parâmetros utilizados no docagem para as estruturas de interesse.



Fonte: Próprio autor. A superfície do complexo 3R-Hidroxiacil-ACP-Desidratase é representada em cor roxa. O arcabouço dos ligantes estudados pode ser visualizado acima da linha azul que divide os parâmetros utilizados logo abaixo, ao lado direito.

3.3 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM DOCAGEM MOLECULAR

Depois de devidamente preparados, as 200 estruturas de interesse foram submetidas às simulações de docagem molecular, utilizando-se o protocolo previamente validado por redocagem. Os valores dos resultados de Fitness Score (FS) para cada complexo estão representados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Valores de FS para os complexos selecionados.

Classificação	Ligante (R)	FS	Ligante (S)	FS
1	4-O-RR	94,10	6-O-2-SS	91,75
2	6-O-RS	93,40	4-O-SS	90,19
3	4-O-RS	88,61	81-O-S	74,06
4	6-O-RR	85,24	60-O-S	73,33
5	79-O-R	74,21	80-O-S	73,31
6	80-O-R	74,18	97-O-S-E	72,52
7	75-O-R	73,73	45-O-S	71,83
8	86-O-R	73,12	79-O-S	71,54
9	63-O-R	72,79	46-O-S	70,92
10	60-O-R	72,69	55-O-S	70,57
11	97-O-R-E	72,28	64-O-S	70,24
12	81-O-R	72,18	67-O-S	70,22
13	61-O-R	71,93	44-O-S	69,88
14	99-O-R-E	71,76	49-O-S	69,80
15	74-O-R	71,39	21-O-S	69,78
16	33-O-R	71,37	65-O-S	69,74
17	88-O-R	71,30	70-O-S	69,71
18	64-O-R	71,23	75-O-S	69,66
19	84-O-R	71,17	68-O-S	69,57
20	57-O-R	71,11	29-O-S	69,44
21	85-O-R	71,08	99-O-S-E	69,17
22	22-O-R	70,96	61-O-S	68,88
23	29-O-R	70,75	14-O-S	68,80
24	29-O-R	70,62	56-O-S	68,80
25	89-O-R	70,57	34-O-S	68,77
26	83-O-R	70,50	62-O-S	68,30
27	21-O-R	70,28	28-O-S	68,23
28	55-O-R	70,25	82-O-S	68,12
29	23-O-R	70,10	69-O-S	68,07
30	38-O-R	69,95	85-O-S	68,04

FSE: 60,72

Fonte: Próprio autor.

Os ácidos sulfênicos (R e S), correspondentes as tioureias de interesse, foram então submetidos a docagem molecular e a seleção dos complexos foi baseada em seus respectivos valores de fitness. A seleção se deu em pares, ou

seja, para que uma tioureia fosse elencada como um potencial inibidor, seus respectivos derivados de ácido sulfênico em suas configurações R e S deveriam estar classificados entre critérios pré-definidos.

Inicialmente, realizou-se uma pré-filtragem, na qual os compostos selecionados deveriam exibir valores de FS, pelo menos, 10 pontos acima do inibidor co-cristalizado ao alvo molecular, **FSE**. Como o maior valor de FS exibido para a **FSE** após a redocagem foi igual a 60,72 (**Tabela 5**), considerou-se as soluções de derivados de ácido sulfênico que exibiram valores de FS acima de 70, totalizando, portanto, 30 soluções de ácidos sulfênicos R e S para dar prosseguimento a triagem. Após essa pré-filtragem, organizou-se os derivados R e S em ordem decrescente de FS e, selecionou-se apenas os pares de estereoisômeros estavam presentes dentre os 10 primeiros colocados, ou seja, foram selecionados apenas as estruturas que apresentassem ambos os estereoisômeros (R e S) dentre os 10 mais bem classificados, conforme indicado pelas diferentes cores na Tabela 6.

Tabela 6. Estruturas selecionadas dentre os 10 primeiros colocados.

Classificação	Ligante (R)	Fitness	Ligante (S)	Fitness
1	4-O-RR	94,10	6-O-2-SS	91,75
2	6-O-RS	93,40	4-O-SS	90,19
3	4-O-RS	88,61	81-O-S	74,06
4	6-O-RR	85,24	60-O-S	73,33
5	79-O-R	74,21	80-O-S	73,31
6	80-O-R	74,18	96-O-S-E	72,52
7	75-O-R	73,73	45-O-S	71,83
8	86-O-R	73,12	79-O-S	71,54
9	63-O-R	72,79	46-O-S	70,92
10	60-O-R	72,69	55-O-S	70,57

Fonte: Próprio autor. Os ligantes grifados em coloração igual, correspondem àqueles que cumprem os critérios estabelecidos e, portanto, podem ser selecionados para avaliações posteriores.

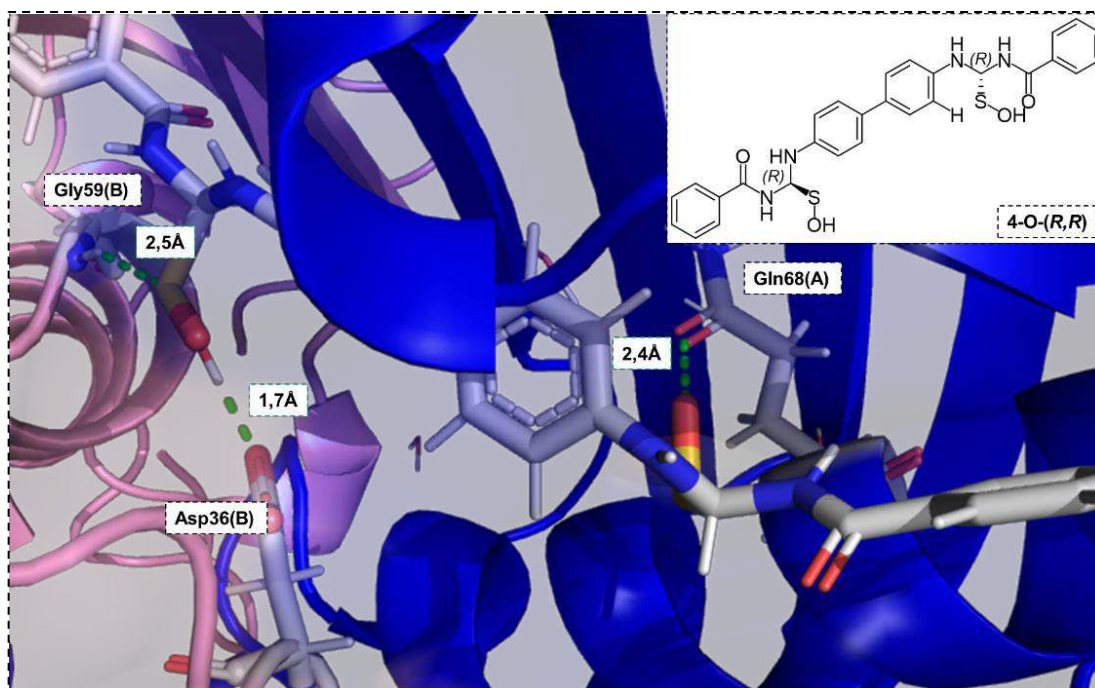
De um modo geral, analisando-se os quatro ácidos sulfênicos e seus respectivos estereoisômeros selecionados (**Tabela 6**), pode-se observar que os estereoisômeros *R* apresentaram maiores valores de FS do que os de configuração *S*, indicando uma certa estereoseletividade no processo de reconhecimento molecular. Para melhor compreensão desse fenômeno e dos valores de FS, foram analisadas as interações realizadas entre as estruturas selecionadas e o alvo

molecular (**Figuras 1 a 4**, Apêndice B).

As interações foram avaliadas com foco na díade catalítica His41(B) e Asp36(B), uma vez que esses resíduos apresentam com maior relevância para a atividade enzimática do alvo molecular, bem como a quantidade de interações de van der Waals com os resíduos de Tyr65(A), Gln68(A), Ala69(A), Phe72(A), Thr79(A), Glu81-Ala-Gln-Ile-Val-Gln86(A), e Leu142(A) apresentadas para cada ligante avaliado.

Para o composto **4**, dos três estereoisômeros avaliados, a configuração **4-O-(R,R)** foi a que exibiu a melhor pose no alvo molecular em termos de FS (94,10), logo em seguida e não muito distante, o estereoisômero **4-O-(S,S)** exibiu um valor muito próximo de FS de 91,75 e, por fim o estereoisômero **4-O-(R,S)** encontra-se em seguida com um FS de 88,61.

Figura 23. Avaliação tridimensional das interações com o composto **4-O-(R,R)**.



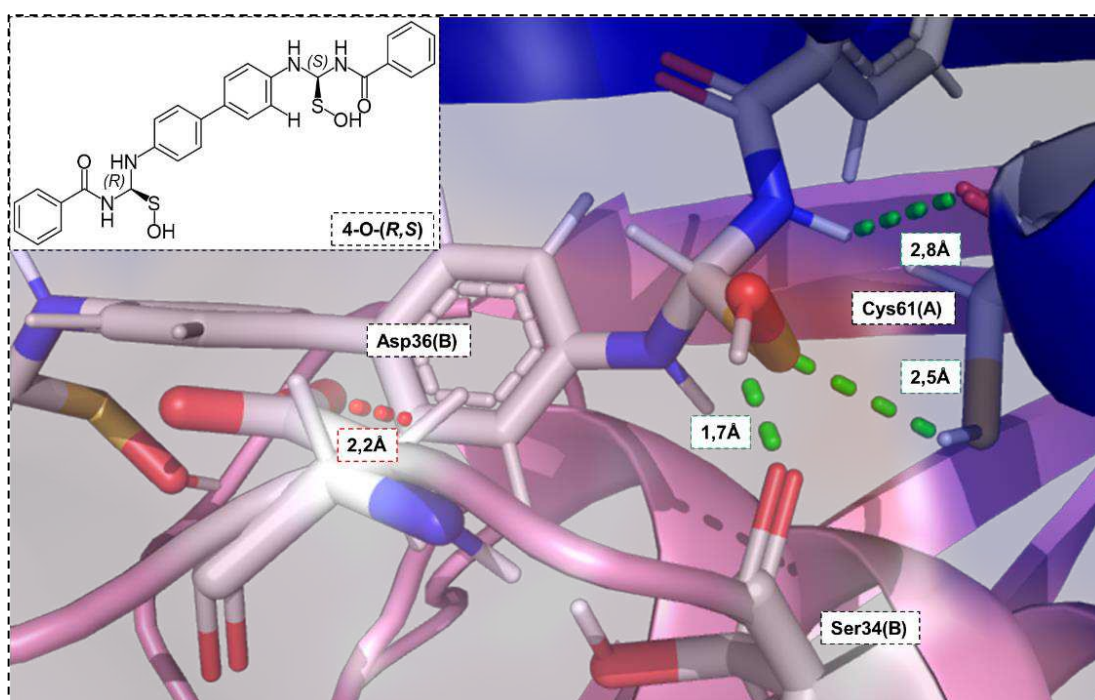
Fonte: Próprio autor.

Dos três complexos obtidos, notou-se que o estereoisômero **4-O-(R,R)** (**Figura 23**) possuía maior número de ligações de hidrogênio. Essas interações são realizadas com os resíduos Asp36(B), Gly59(B) e Gln68(A). Em relação às interações de Van der Waals observadas, houve 23 pontos de interação observados para o mesmo complexo do estereoisômero (R,R) sendo um número ligeiramente menor do que o observado para os estereoisômero (R,S) com 25 interações de Van

der Waals e (S,S) com 29 interações de Van der Waals. O estereoisômero (R,R) ainda apresentou duas interações do tipo π -alquil sendo esse tipo de interação também observado para os outros estereoisômero (R,S) e (S,S).

Dos estereoisômero avaliados podemos destacar aspectos relevantes que podem influenciar a magnitude dos valores de FS obtidos. O estereoisômero **4-O-(R,S)** (Figura 24) apresentou uma interação desfavorável com o resíduo Asp36(B). Considerando os aspectos do alvo molecular, principalmente a relevância deste resíduo para o alvo molecular sendo ele parte da díade catalítica, justifica-se que uma interação desfavorável com tal resíduo contribua para uma redução do valor de FS ao alvo. Em contrapartida, uma interação do tipo π -S foi observada com o outro resíduo da díade catalítica, His41(B). Além disso, o resíduo de Cys61(A) exibiu uma interação do tipo ligação de hidrogênio, sendo um importante resíduo envolvido na interação do grupo farmacofórico observado outrora para **ISO**. A atividade no alvo molecular desempenhada pelo **ISO** envolve a formação de uma ponte dissulfeto com o resíduo Cys61(A) e, apesar da diferença de natureza de interação observada, ainda é uma observação positiva em relação a complementariedade com o alvo molecular. O conjunto dos fatores pode acabar atenuando a contribuição negativa da interação desfavorável com o resíduo Asp36(B).

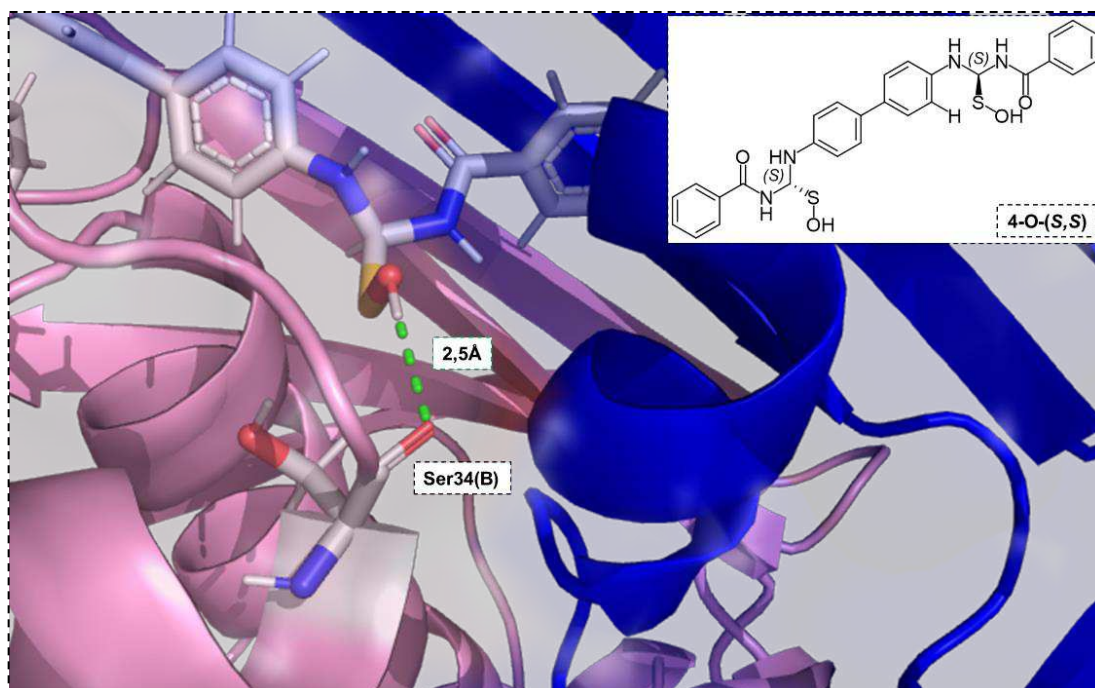
Figura 24. Avaliação tridimensional das interações com o composto **4-O-(R,S)**.



Fonte: Próprio autor.

O estereoisômero **4-O-(S,S)** (Figura 25) apresentou interações também com os resíduos que compõem a tríade catalítica, Asp36(B) e His41(B), contudo, diferente do que pode ser observado no caso do estereoisômero (*R,R*), o tipo de interação envolvida no posicionamento do ligante envolve um par de elétrons do resíduo de Asp36(B), empilhado de forma perpendicular em relação ao plano π de um anel aromático da estrutura do estereoisômero (*S,S*). Tal fato comparado com o tipo de interação observado para o caso do estereoisômero (*R,R*) pode sugerir que em termos de contribuição ao ajuste do ligante, a ligação de hidrogênio apresenta maior relevância e impacto do ponto de vista de reconhecimento e ajuste no sítio ativo do alvo molecular. Observa-se um envolvimento do resíduo de His41(B) também, incluso no conjunto de interações de Van der Waals, que no total somam 30 observações.

Figura 25. Avaliação tridimensional das interações com o composto **4-O-(S,S)**.



Fonte: Próprio autor.

Além das diferenças destacadas do ponto de vista de interações com os resíduos da díade catalítica, outros tipos de interação envolvendo elétrons π , foram observadas, porém, o conjunto destas interações alinhado com as observações obtidas em relação aos resíduos relevantes do alvo, podem contribuir satisfatoriamente com o ajuste e complementariedade em relação ao alvo molecular. Esse cenário, alinhado a ausência de uma interação desfavorável tal qual observada

para o estereoisômero (*R,S*), influenciam na obtenção de um FS intermediário, em relação ao que pode ser observado para as demais estruturas do ligante **4**.

As águas elencadas no modelo avaliado, apresentaram proximidades interessantes com os resíduos e ligantes avaliados no estudo, porém, as interações observadas para o ligante **4** classificam-se como interações de Van der Waals. Tendo como característica as possíveis interações que podem ser desempenhadas pela água no reconhecimento molecular, não se espera uma contribuição significativa destas para as poses experimentais obtidas.

Em resumo, as observações acerca dos padrões de poses experimentais obtidas para o ligante **4** levam a constatar que existe uma contribuição importante das interações do tipo ligação de hidrogênio na magnitude de FS obtido. Interações desfavoráveis obtidas comprometem o processo de reconhecimento molecular no sítio ativo do alvo molecular, fato este que já é esperado. Além disso, um padrão dessas interações desfavoráveis sugere que ocorram principalmente entre resíduos e espécies de característica doadora de ligações de hidrogênio que aumentam fenômenos de repulsão entre os resíduos e dificulta a aproximação do ligante dos resíduos importantes do alvo molecular. As interações de Van der Waals podem contribuir para características de ajuste no alvo molecular reforçando aspectos de complementariedade com o alvo e sua natureza, contudo, com menor relevância do que o considerado para as ligações de hidrogênio.

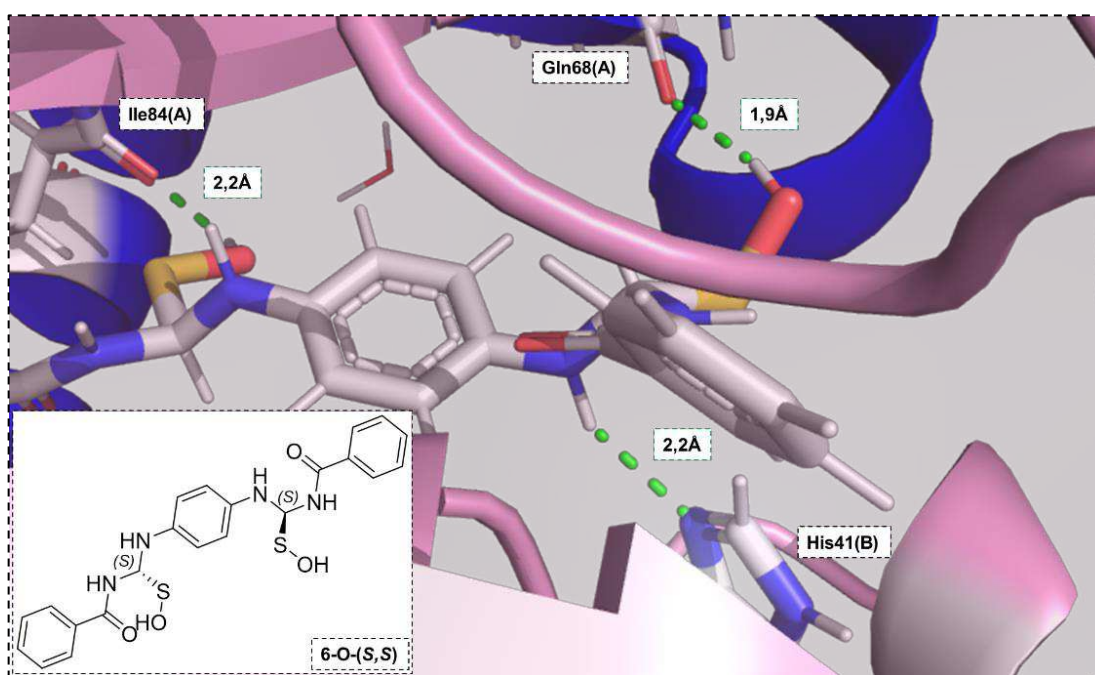
Para a substância **6** três estereoisômeros foram observados durante a análise dos ligantes, tal como observado para a **4**, o que já era esperado já que as duas moléculas se tratam de bis-benzoiltioureia. Destes três, o estereoisômero que exibiu melhor posicionamento, de FS 93,40, exibe configuração (*R,S*), logo em seguida o estereoisômero (*S,S*) com um FS de 91,75 e, por último, o estereoisômero (*R,R*) com FS de 85,24.

Para o **6-O-(S,S)** (**Figura 26**) foram observadas três interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Ile84(A), Gln68(A) e His41(B). Em relação às interações de Van der Waals, 24 observações foram elencadas. Outros tipos de interações também foram possíveis de observar envolvendo participação de elétrons π com cadeias alquílicas e S do ácido sulfênico. Uma interação entre o resíduo Met60(B) foi identificada entre o sistema π de um anel aromático terminal do estereoisômero que se encontra perpendicular ao resíduo de aminoácido mencionado. Interações desfavoráveis não foram identificadas para este complexo, ou seja, nenhuma

interação aparenta ter ocorrido de forma inadequada que influencie em um decréscimo da magnitude de FS observado.

Entre as interações importantes do complexo relacionado ao estereoisômero (*S,S*) (**Figura 26**) se destacam interações com os resíduos da díade catalítica em que uma das interações envolvidas seria uma ligação de hidrogênio com o resíduo His41 (B) e o H do NH da tiouréia e; o resíduo Asp36 (B) está inserido dentre as interações de Van der Waals observadas. Além disso, o sistema π de um dos anéis aromáticos é capaz de interagir com o resíduo de Cys61(A) revelando um aspecto desejável de interação quando comparado com os padrões observados para o **ISO**. Ou seja, os resíduos de díade catalítica e aminoácido envolvido na formação da ponte dissulfeto com o **ISO**, são observados na interação com o estereoisômero (*S,S*) do composto **6**. Esses fatores podem ser decisivos em contribuir com níveis adequados de complementariedade do alvo molecular que explicam a magnitude do FS obtido para tal complexo.

Figura 26. Avaliação tridimensional das interações com o composto **6-O-(S,S)**.



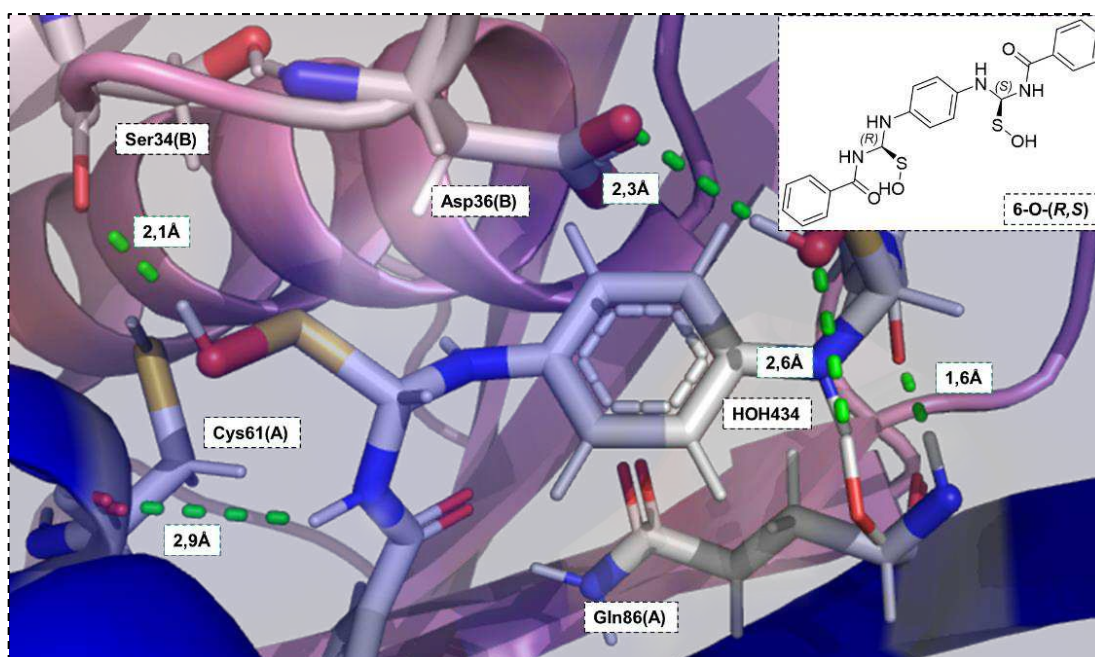
Fonte: Próprio autor.

O complexo do estereoisômero **6-O-(R,S)**(**Figura 27**) exibiu 22 interações de Van der Waals no diagrama, um número ligeiramente menor que o observado para o estereoisômero (*S,S*). Em contrapartida, 5 interações do tipo ligação de hidrogênio foram identificadas envolvendo os resíduos Asp36(B), Gln86(A),

Ser34(B), Cys61(A) e HOH434. Interações envolvendo elétrons π estiveram relacionadas com o resíduo Met60(B) e His41(B) do tipo π -S e uma do tipo π - π . As interações π -S são passíveis de ocorrerem conforme disposição perpendicular do átomo de S do resíduo Met60(B) em relação ao plano π do anel aromático, sendo uma interação semelhante à observada para o estereoisômero (S,S).

Os resíduos da díade catalítica interagem de forma bem próxima com diferentes tipos de interação. O resíduo de His41 (B) é passível de interagir através do sistema π disposto no anel imidazólico do resíduo com o S do ligante, sendo este um tipo interação semelhante ao observado anteriormente para Met60(B). Já o resíduo Asp36(B) pode interagir por uma ligação de hidrogênio com o ácido sulfênico da estrutura ativa do estereoisômero (R,S) enquanto que um dos resíduos de água catalíticas definidas anteriormente é possível de formar ligação de hidrogênio com o O do ácido sulfênico. Apesar da hipótese desta água poder auxiliar como um meio de ancoragem com outro resíduo de aminoácido, nenhuma interação adicional foi observada envolvendo esta água. Tais fatores discutidos anteriormente, podem contribuir para que o complexo exibido a partir do estereoisômero (R,S) apresente um valor de FS maior que o complexo do estereoisômero (S,S).

Figura 27. Avaliação tridimensional das interações com o composto **6-O-(R,S)**.



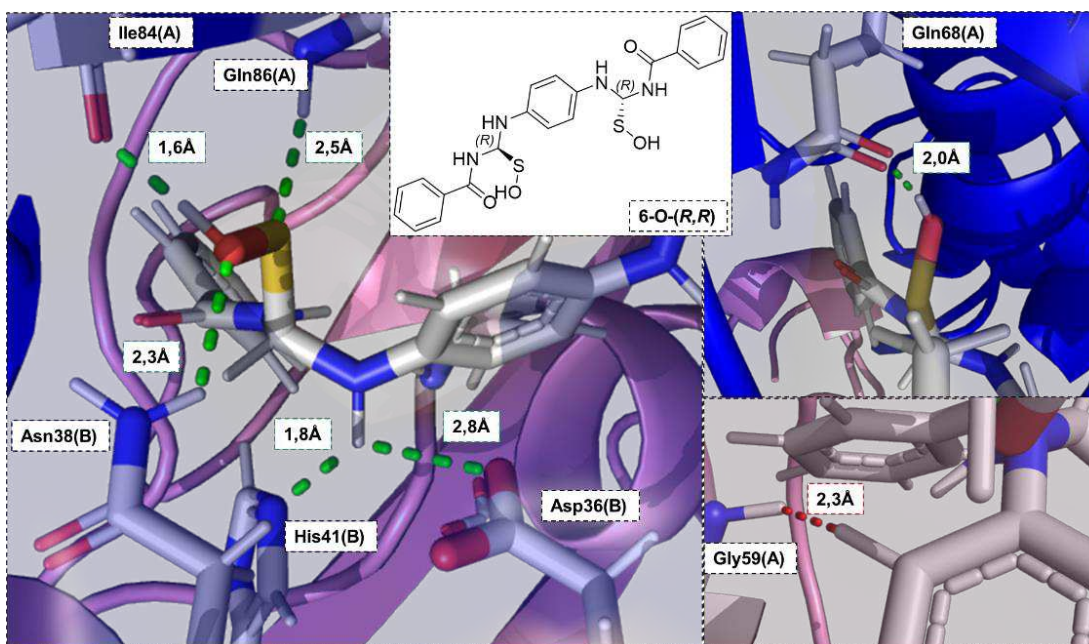
Fonte: Próprio autor.

Para a estrutura do estereoisômero **6-O-(R,R)** (Figura 28) destaca-se

a existência de uma interação desfavorável, decorrente da aproximação de dois grupos doadores de elétrons envolvendo o resíduo Gly59 (B) e o N do C carbonílico vicinal ao ácido sulfênico. Essa interação desfavorável, uma vez que envolve dois grupos doadores de elétrons, pode contribuir com uma repulsão importante que impede a aproximação efetiva das duas áreas das moléculas influenciando negativamente o valor de FS obtido para o complexo por comprometer a complementariedade com o alvo.

Embora a existência da interação desfavorável fosse observada, seis ligações de hidrogênio são exibidas para a estrutura. Dessas seis interações, duas estão envolvidas com os resíduos His41 (B) e Asp36 (B), cujas características já foram anteriormente discutidas. Além disso, uma interação do tipo π -alquil é observada envolvendo o resíduo Cys61 (A) e o ciclo aromático terminal, do lado oposto à interação desfavorável. Os pontos de interações de Van der Waals somaram ao todo 20 observações, sendo um número também ligeiramente menor quando comparado às configurações (R,S) e (S,S). Ou seja, as interações favoráveis com resíduos importantes do alvo molecular aparentam atenuar os efeitos negativos sobre o valor de FS observado.

Figura 28. Avaliação tridimensional das interações com o composto **6-O-(R,R)**.



Fonte: Próprio autor.

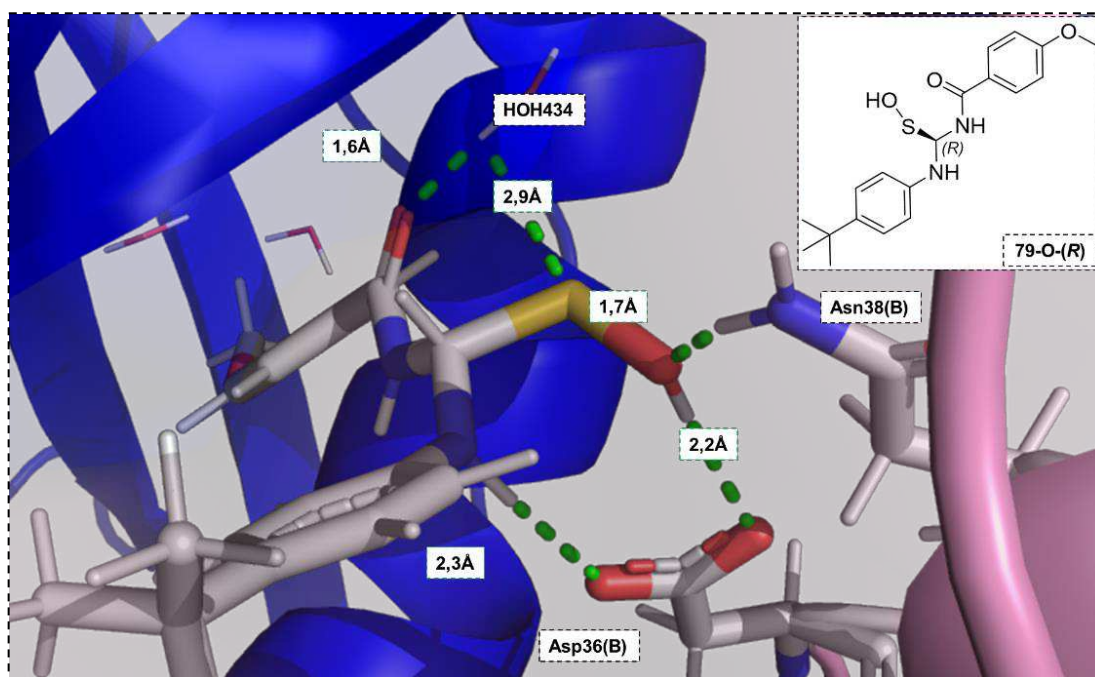
Para o composto **79** o enantiômero que apresentou melhor posicionamento em relação ao alvo molecular, foi o **79-O-R** (Figura 29) com um FS

de 74,21, enquanto, o enantiômero **79-O-S** (Figura 30) apresentou o pior posicionamento dentre os complexos selecionados conforme discutido anteriormente, com um FS de 71,54.

O composto **79-O-(R)** (Figura 29) apresentou um número de interações do tipo Van der Waals moderadamente menor que as bis-benzoiltioureas **4** e **6** discutidas anteriormente, com um total de 18 observações. Isso pode ser atribuído a diferença de tamanho observada entre as moléculas mencionadas, que acarreta uma menor superfície disponível para que interações desta natureza ocorram. Dois resíduos e uma água demonstraram capacidade de interagir por ligações de hidrogênio sendo eles Asn38 (B), Asp36 (B) e HOH3 (HOH434). Dessas observações, a Asp36 (B) e a HOH3 apresentam capacidade de interagir com dois pontos diferentes do ligante **79-O-(R)** cada um, totalizando cinco ligações de hidrogênios possíveis exibidas no complexo.

Interações do tipo π -alquil e π -S foram exibidas também para este complexo. A interação π -S ocorre entre o S do ácido sulfênico alinhado com o sistema π do anel aromático do resíduo de Tyr65 (A), enquanto, as interações π -alquil a partir do alinhamento de cadeias alquílias dos resíduos Leu142 (A) e Val85 (A) com os sistemas π dos anéis aromáticos do ligante avaliado.

Figura 29. Avaliação tridimensional das interações com o composto **79-O-(R)**.



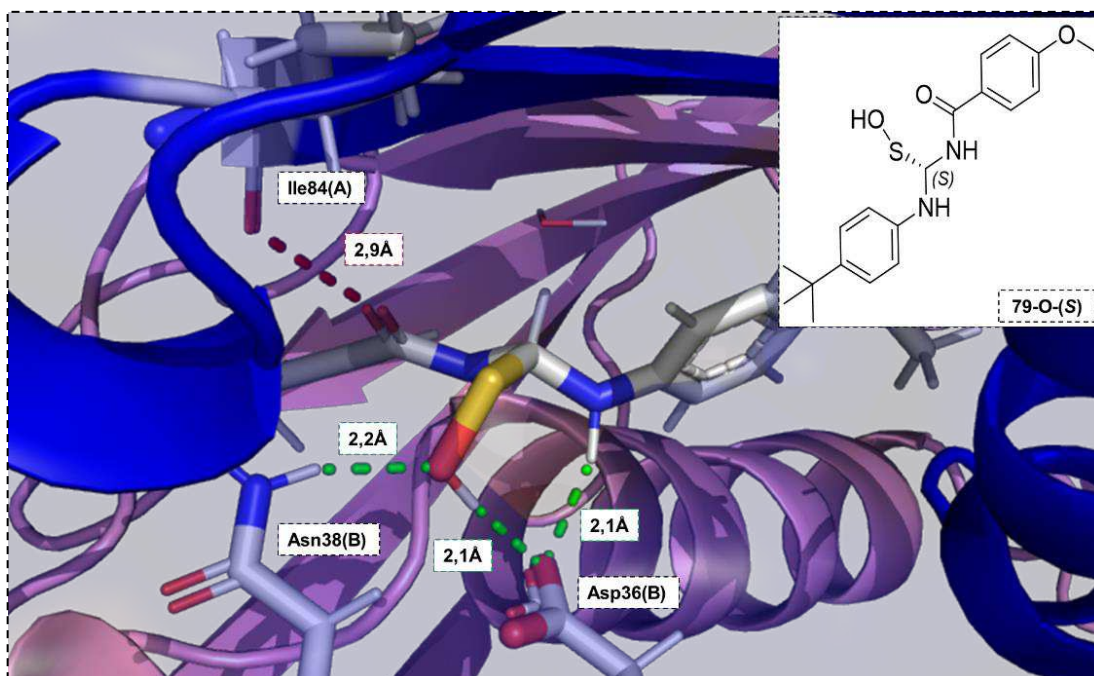
Fonte: Próprio autor.

O enantiômero **79-O-S** (Figura 30) exibiu uma quantidade menor de

possibilidade de ligações de hidrogênio, com um total de três ligações possíveis, sendo duas delas provenientes do resíduo Asp36(B) com o S e NH da tiouréia e, a outra, entre Asn38(B) e O do ácido sulfênico. As observações em relação às interações de Van der Waals se aproximaram bastante do que foi observado para o enantiômero R, com um total de 17 observações. Destas observações relacionadas ao número de interações de Van der Waals podemos destacar o envolvimento do resíduo Cys61 (A) que apresenta proximidade do ligante na pose observada, porém, distante do S do ácido sulfênico. Alinhado com essas diferenças nas interações, uma interação desfavorável envolvendo o resíduo Ile84(A) e o O carbonílico pode ser observada, do tipo Acceptor-Acceptor.

Da mesma forma que já discutido anteriormente para a interação desfavorável entre grupos doadores de ligação de H, o tipo acceptor-acceptor pode ocasionar fenômenos de repulsão entre as estruturas da região. Esse fenômeno pode dificultar a aproximação de resíduos da região culminando em uma baixa interação entre o ligante e o alvo molecular impactando negativamente o valor de FS exibido.

Figura 30. Avaliação tridimensional das interações com o composto **79-O-(S)**.



Fonte: Próprio autor.

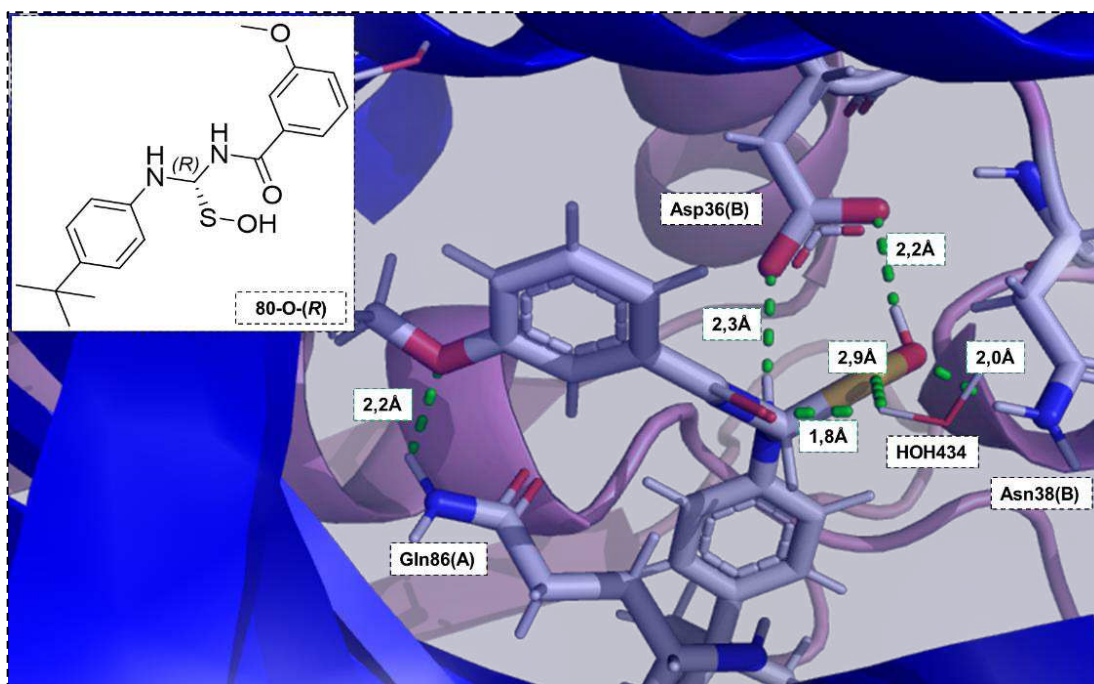
Por fim, em relação aos complexos avaliados derivados dos posicionamentos do composto **80** evidenciaram um melhor ajuste para configuração

do enantiômero (*R*) (**Figura 31**), com um FS de 74,18, enquanto, o enantiômero (*S*) (**Figura 32**) apresentou um valor de FS de 73,31, ligeiramente menor que a configuração (*R*).

O enantiômero (*R*), **80-O-R**, apresentou 14 observações de interações de Van der Waals. Destas observações, está incluída a presença da His41 (B) em região próxima ao anel fenólico do ligante **80** (*R*). Além disso, o resíduo Cys61 (A) aparenta estabelecer uma interação de cadeia alquila com a região de hidroxila do anel fenólico. Essas interações, apesar de reforçar certa complementariedade do ligante em relação ao alvo molecular, ainda são muito fracas para contribuir com uma magnitude alta de valor de FS.

O resíduo Asp36 (B), tal como já observado para outros ligantes avaliados neste estudo, apresentou interação do tipo ligação de H com OH do ácido sulfênico e o NH adjacente ao C do ácido sulfênico, dois pontos de interação possíveis. Além destas interações, outras ligações de H possíveis foram também observadas entre os resíduos Asn38 (B) e Gln86 (A) e a água HOH3, totalizando cinco interações do tipo ligação de H possíveis para o enantiômero (*R*) do composto **80**. Uma interação do tipo π -S é observada entre o S do ácido sulfênico e o resíduo Tyr65 (A).

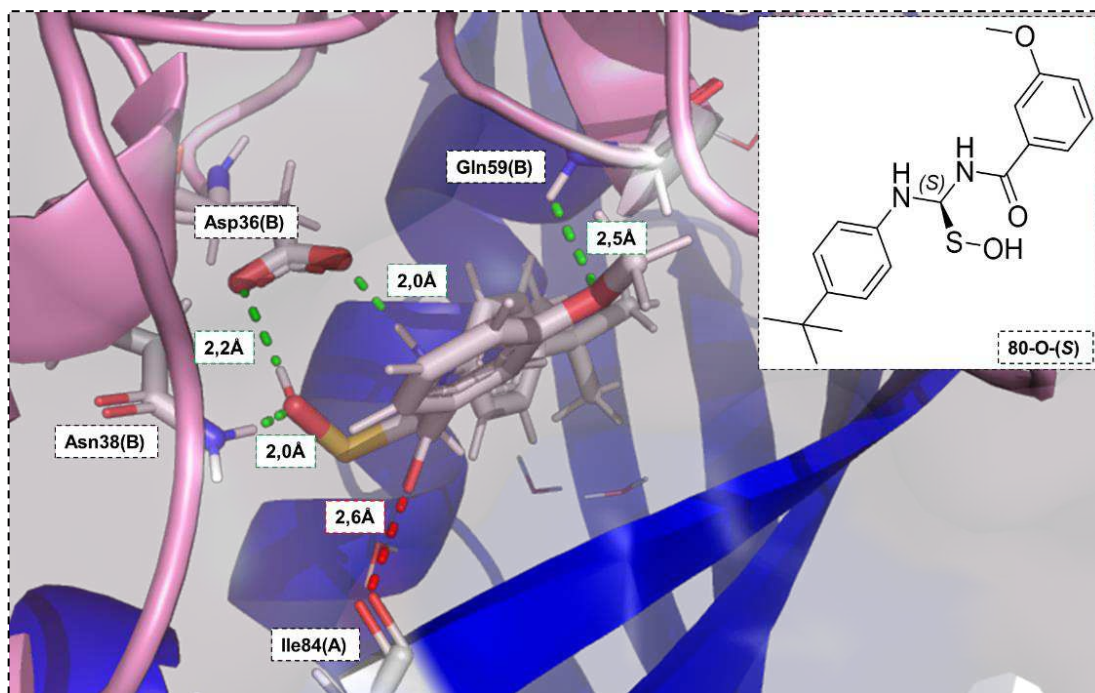
Figura 31. Avaliação tridimensional das interações com o composto **80-O-(R)**.



Fonte: Próprio autor.

O enantiômero (S) contudo, apresenta uma interação desfavorável tal qual observada e discutida para o composto **79** (S) com o mesmo resíduo de aminoácido, Ile84 (A). Desta forma, os aspectos de interação e impactos negativos sobre o valor de FS já são previstos tal qual discutidos anteriormente. Três ligações de H são possíveis de serem observadas para o complexo derivado do enantiômero (S) envolvendo os resíduos Asn38 (B), Asp36 (B) e Gly59 (B). Destas interações destaca-se o envolvimento de Asp36 (B). Uma interação com o resíduo His41 (B) também é observada, envolvendo o anel aromático do fenol na estrutura do ligante. Enquanto isso, uma interação é possível de ser observada também envolvendo o resíduo de Cys61 (B) contudo, distante do S do ácido sulfênico. Apesar deste envolvimento de resíduos conhecidamente importantes para a atividade da enzima, com exceção da interação relatada envolvendo o resíduo de Asp36 (B), o impacto negativo sobre o valor de FS acaba sendo pouco atenuado.

Figura 32. Avaliação tridimensional das interações com o composto **80-O-(S)**.



Fonte: Próprio autor.

De modo geral, observou-se uma quantidade menor de interações de Van der Waals derivadas das benzoiltioureias quando comparadas com as bis-benzoiltioureias. Um fator que pode ser determinante para tal diferença estaria ligado ao tamanho exibido pelas moléculas comparadas neste estudo. Os compostos **79** e **80** apresentavam quantidades de observações relacionadas a pontos de interação de

Van der Waals sempre abaixo de 20, enquanto, a quantidade do mesmo tipo de interação para as bis-benzoiltioureas, compostos **4** e **6**, apresentavam quantidade de observações sempre maiores, em média acima de 22. Isso revela que o tamanho da molécula tem um papel importante a ser desempenhado em termos de complementariedade do alvo molecular já que a possibilidade de interações é favorecida pelo aumento da superfície de contato no alvo molecular.

As diferenças observadas na magnitude dos valores de FS entre os complexos podem ser explicadas por diferenças de interações exibidas para cada ligante com o alvo molecular. Resultados obtidos por Sacco e colaboradores (2007) sugerem que o reconhecimento pelo complexo enzimático pode ser otimizado conforme o aumento da cadeia carbônica. Isso condiz com o próprio papel da enzima (3R)-hidroxiacil-ACP-desidratase dentro do complexo FAS-II já que sua ação tem como alvo cadeias de ácidos meromíclicos de tamanho intermediário de característica predominantemente hidrofóbica. Resultados experimentais correlacionam o aumento da atividade do heterodímero HadB conforme o aumento da cadeia carbônica do intermediário metabólico da via enquanto, para HadA, notou-se uma especificidade para hexadecanoil-CoA, cadeia com tamanho intermediário de C₁₆.

As características discutidas anteriormente justificam a escolha das interações de Van der Waals como importantes contribuintes na avaliação das possíveis interações entre as classes dos complexos. O aumento do esqueleto carbônico incrementa as interações intermoleculares do tipo Van der Waals. Além disso, de modo análogo, os intermediários presentes no complexo FAS-II podem apresentar características de interações intermoleculares semelhantes.

Interações desfavoráveis foram observadas para pelo menos um complexo dentre cada ligante avaliado. Além disso, a ocorrência desse tipo de interação, apareceu associado sempre ao ligante de menor FS dentro do grupo comparado. Ou seja, as interações desfavoráveis desempenham um papel importante em impactar negativamente o ajuste e posicionamento do ligante no alvo molecular. É possível ainda afirmar, que a proximidade de agrupamentos de mesma natureza (doadores, aceptores) podem ser determinantes na ocorrência deste tipo de interação desfavorável.

3.4 PREVISÕES *IN SILICO* DE PARÂMETROS DE FÁRMACO-SIMILARIDADE

As avaliações dos parâmetros *in silico* ocorreram para os compostos selecionados na triagem virtual (**4**, **6**, **79** e **80**), considerando-se das tioureias correspondentes aos ácidos sulfênicos. Isso foi realizado para garantir que as predições desses parâmetros fossem adequadas em relação a forma de administração hipotética da substância. As predições em relação aos parâmetros de fármaco-similaridade foram realizadas por meio dos critérios estabelecidos pela “Regra dos Cinco” (LIPINSKI et al., 2001), comparando-se individualmente as tioureias com os dados obtidos para a estrutura do **ISO** (Tabela 7).

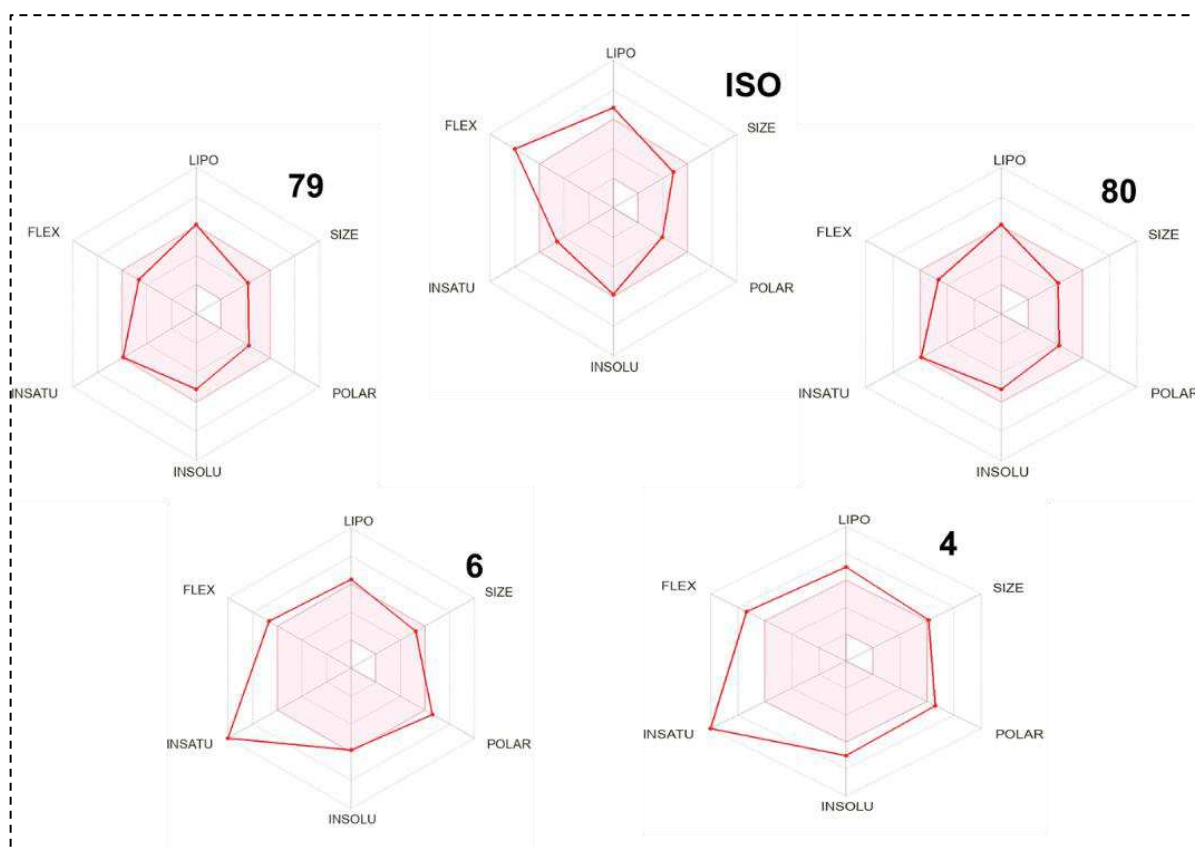
Tabela 7. Parâmetros obtidos pela plataforma SwissADME para os ligantes e **ISO**.

	ISO	4	6	79	80	Especificação das regras
Peso Molecular (Da)	400,58	510,63	434,53	342,46	342,46	< 500 Da
ALH	2	2	2	2	2	< 10
DLH	2	4	4	2	2	< 5
LogP	4,18	3,73	2,70	2,95	2,95	< 4,15 (mLogP)
TPSA (Å²)	74,61	146,44	146,44	82,45	82,45	< 140 Å ²
nrot	12	11	10	7	7	< 10

Fonte: Próprio autor. *Valores destacados em vermelho representam pontos fora do limite estabelecido pelas regras.*

O **ISO** como já identificado anteriormente, apresenta extrapolações de características de lipofilicidade e flexibilidade que podem ser observados pela fuga das linhas vermelhas da região preenchida em vermelho claro (**Figura 33**). O mesmo não é observado para as duas benzoiltioureias (**79** e **80**) selecionadas no estudo de triagem, revelando aspectos desejáveis bem próximos de fármaco-similaridade. Em contrapartida, as bisbenzoiltioureias (**4** e **6**) exibiram violações para a maioria dos parâmetros avaliados na área de aspectos de fármaco-similaridade.

Figura 33. Aspectos fármaco-similares obtidos para avaliação da regra dos cinco de Lipinski para ISO e para as benzoiltioureias.



Fonte: Próprio autor. A área preenchida em vermelho claro destaca as observações mais comuns observadas para a maioria dos fármacos, tidas como referência para avaliação dos parâmetros de fármaco-similaridade.

Reforçando as diferenças observadas entre as bisbenzoiltioureias (**4** e **6**) e as benzoiltioureias (**79** e **80**), comparadas com o **ISO**, podemos dividi-las em dois grupos através de seus pesos moleculares (PM). As bis-benzoiltioureias possuem uma estrutura mais extensa e exibem massa molecular mais elevada (> 400 Da). Enquanto para o **ISO**, tal valor foi de 400,58 Da e, para as benzoiltioureias selecionadas, foram menores do que 400 Da. Dentre as bis-benzoiltioureias, um alerta foi observado relacionado ao composto **4**, pois este apresenta uma violação das regras de Lipinski, cuja massa molecular foi igual a 510,63 Da, encontrando-se acima do limite estabelecido (PM < 500 Da). As demais tioureias avaliadas não exibiram nenhuma violação adicional de PM e/ou outro critério estabelecido por Lipinski. Esse alerta pode descrever possíveis problemas de difusão da substância no espaço intercelular ou intracelular já que, moléculas de elevada massa molecular tendem a apresentar um movimento mais lento, dificultando principalmente o seu transporte passivo pelas membranas, o que pode acarretar baixa absorção e biodisponibilidade por via oral.

Uma violação associada ao **ISO** está relacionada ao $mLogP > 4,15$ (4,18) indicando uma alta lipofilicidade e, conseqüente, alta permeabilidade frente a membranas biológicas, porém, esta não foi observada para as benzoiltioureas selecionadas. Apesar disso, as benzoiltioureas apresentaram baixa solubilidade em água, expressas por meio de valores de negativos de alta magnitude de $LogS$. Essas observações podem impactar negativamente na absorção e biodisponibilidade oral dessas substâncias pelo trato gastrointestinal (LIPINSKI et al., 2001).

Em contraste com o que é discutido para **ISO**, ainda assim os valores de $mLogP$ exibidos pelos ligantes **4** (3,73), **6** (2,70), **79** (2,95) e **80** (2,95) estiveram bem abaixo do ponto de corte estabelecido pela regra de Lipinski. Tal fato pode sugerir uma possível característica desejável relacionada a biodisponibilidade oral, já que mesmo com um $mLogP$ de 4,18 sendo limítrofe do ponto de corte da regra de Lipinski, o **ISO** ainda possui problemas de biodisponibilidade oral conforme relatado em literatura (KORDULÁKOVÁ et al., 2007; WANG; HICKEY, 2010b).

Com relação a extensão de Veber, as bis-benzoiltioureas (**4** e **6**) exibiram valores muito próximo de ligações rotacionáveis (nrot), 11 para o composto **4** e 10 para o composto **6**, sendo estes valores muito próximos do observado para **ISO**, com nrot 12. Apesar da flexibilidade ser um aspecto desejável do ponto de vista de ajuste no alvo molecular, os valores acima do especificado podem sinalizar uma dificuldade para as moléculas em se manter em conformação estável. Além disso, dificuldades de absorção por passagem nas membranas podem ser observadas já que o custo entrópico para mudanças conformacionais se eleva (VEBER et al., 2002). Os valores de nrot para as substâncias **79** e **80**, em contrapartida, revelam um aspecto mais brando de flexibilidade sem comprometer características de absorção.

Os compostos **4** e **6** exibiram violação do limite de parâmetro TPSA. Essa violação ocorreu apenas para estas duas substâncias e podem exibir características indesejáveis de biodisponibilidade oral. O mesmo não foi observado para **ISO**, que apesar do que se conhece frente aos problemas enfrentados em relação a sua biodisponibilidade, exibiu um valor de TPSA menor do que todos os ligantes avaliados.

O score de biodisponibilidade exibiu as mesmas medidas para **ISO** e os derivados de benzoiltiourea avaliados. O valor obtido de 0,55 revela uma probabilidade moderada de penetrar células CACO-2, sendo este um sinal importante do ponto de vista de biodisponibilidade oral. No entanto, diante das observações já

relatadas para o **ISO** em relação a sua biodisponibilidade, o valor de 0,55 para as benzoiltioureias pode representar uma preocupação no quesito de administração oral como fármaco. Essa linhagem é relatada frente as observações de estudos de biodisponibilidade para a grande maioria dos fármacos estudados (LIPINSKI et al., 2001; WANG; HICKEY, 2010b).

3.4.1 Testes de Solubilidade

Baseado no histórico conhecido para **ISO** e suas características físico-químicas e, também, nas observações a respeito das medidas *in silico* de parâmetros de solubilidade como LogS discutidas anteriormente, testes de solubilidade foram realizados com o intuito de confirmar as observações discutidas e definir uma concentração mínima aceitável para o preparo de soluções para testes *in vitro*. As observações foram resumidas na tabela a seguir.

Tabela 8. Resumo do preparo e resultados dos testes de solubilidade realizados.

Substância	Massa (g)	Volume (H ₂ O)	Resultado (H ₂ O)	Volume (DMSO)	Resultado (DMSO)
4	0,0099	5 mL	Insolúvel	5 mL	Solúvel
6	0,0103	5 mL	Insolúvel	5 mL	Parcialmente solúvel
79	0,0098	5 mL	Insolúvel	5 mL	Solúvel
80	0,0093	5 mL	Insolúvel	5 mL	Solúvel

Fonte: Próprio autor.

Os testes foram conduzidos em DMSO e água destilada para verificação dos aspectos de solubilidade. Os resultados obtidos nos testes com água foram congruentes com as observações discutidas nas predições *in silico*. É válido ressaltar que as características estruturais dos compostos **4**, **6**, **79** e **80** podem explicar as observações de solubilidade.

Todos os quatro compostos apresentaram-se insolúveis em água, que pode ser explicado pelo grande esqueleto carbônico que se apresentam com poucos pontos possíveis de interação do tipo ligação de H que pudessem facilitar interações com a água. Apesar do que isso pode sugerir, os valores de mLogP apresentados

anteriormente para os compostos avaliados, quando comparados com **ISO**, tiveram melhora dos aspectos de solubilidade, contudo, melhora esta insuficiente para configurar uma melhora da solubilidade em meio aquoso (BERGMAN; LAAKSONEN; LAAKSONEN, 1997; KALÉ et al., 1999; LAAKSONEN, 1992).

Os sistemas que utilizam como solvente Água ou DMSO possuem semelhanças devido ao seu comportamento. Ambas as moléculas possuem momento dipolo significantes, diferindo apenas pelos modelos de interação passíveis de serem realizados pois, a água neste contexto pode agir como uma doadora de ligação de hidrogênio que possui uma solvatação mais eficiente frente algumas espécies químicas. Essa diferença entre os dois sistemas explica possivelmente o sucesso em solubilizar os compostos selecionados utilizando-se DMSO (BERGMAN; LAAKSONEN; LAAKSONEN, 1997; KALÉ et al., 1999; LAAKSONEN, 1992).

Apesar do sucesso em solubilizar os compostos empregando-se DMSO, o sistema empregado durante os testes *in vitro* são baseados em meios aquosos. Testes anteriores revelaram uma falha na execução de experimentos de CIM devido à baixa solubilidade dos compostos em matriz aquosa que culminava na precipitação no meio, dificultando a entrega ao alvo de *Mtb* testado. Diante disso, sistemas de liberação, tal como o lipossoma, se revelaram uma grande alternativa para facilitar a entrega destes compostos ao alvo em teste já que, dadas as suas características de solubilidade, possibilitam a veiculação de compostos lipofílicos encapsulados em matrizes aquosas.

3.5 OBTENÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas obtidos apresentaram soluções de aparência esbranquiçada, porém, sem sinais de precipitação sendo um bom sinal do ponto de vista de solubilidade. Os tamanhos de partícula foram variados entre os compostos encapsulados, porém, apresentaram bons aspectos de homogeneidade das partículas conforme as avaliações de DLS. As eficiências de encapsulamento (EE) foram medidas a partir das curvas de calibração construídas para cada composto (**Figura 5 à Figura 8, Apêndice C**). Os dados relacionados a estrutura do lipossoma podem ser observados de forma sumarizada na **Tabela 9**.

Tabela 9. Parâmetros obtidos para cada lipossoma preparado.

Composto	Tamanho Médio (nm)	Polidispersão (PDI) (%)	Potencial Zeta (mV)
4	213,10	10,63	-10,53
6	389,13	21,20	-18,20
79	611,57	32,13	-10,77
80	1483,00	26,70	-19,90

Fonte: Próprio autor. Os valores apresentados nesta tabela referem-se a valores médios obtidos a partir dos resultados brutos. Para verificação dos resultados na íntegra, consulte o Apêndice D.

De todos os quatro compostos estudados para os lipossomas, o comportamento da substância **4** foi o que exibiu o melhor perfil. As medições sugerem a obtenção de lipossomas com característica de distribuição homogênea que pode ser interpretado a partir da observação dos valores de índice de polidispersão (**Figura 1., Apêndice D**). Os lipossomas possuíam tamanhos variáveis com o valor mínimo médio de 213,10 nm obtido para o composto **4** com um valor máximo médio obtido de 1483,00 nm para o composto **80**. Dentre os quatro compostos empregados para obtenção dos lipossomas, destaca-se a grande variabilidade observada para o tamanho da formulação contendo o composto **80**.

O índice de polidispersão, também abreviado para PDI, trata-se de uma derivação da análise de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS) e mede a amplitude da distribuição de tamanho das partículas de uma suspensão. O intervalo possível de valores de análise que podem ser obtidos variam de 0,00 a 1,00 (0% a 100%). Os valores mais próximos de 0 sugerem uma população de partículas de característica monodispersa e valores mais próximos de 1 sugerem grandes variações no tamanho da partícula (LACATUSU et al., 2012). Sabe-se que valores de polidispersão acima de 0,7 (70%) não são ideais para o emprego de técnicas de DLS (NOBBMANN, 2017). Os valores de polidispersão obtidos variaram entre 10,63% a 32,13% (0,1063 a 0,3213) que sugerem em todas as formulações uma característica de solução monodispersa, sem grandes variações em seus tamanhos de partículas obtidas.

Os lipossomas construídos neste trabalho consideraram como lipídio a fosfatidilcolina de soja (**SPC**), sendo este um fosfolípido zwitterônico de carga neutra devido à presença do grupo fosfato de carga negativa e do grupo colina de

carga positiva (MACHADO et al., 2019). Apesar dessa característica neutra em relação a sua carga que pode sugerir a probabilidade de obtenção de uma partícula de característica neutra, o potencial zeta obtido para as formulações elaboradas apresentou valores médios na faixa de -10,53 mV a -19,90 mV sendo estes negativos. Tal fato pode derivar da presença majoritária dos grupos fosfato em regiões externas da partícula, mais especificamente na superfície, que confere características desejáveis do ponto de vista de solubilidade em meio aquoso e inibição de fenômenos de agregação indesejável das partículas da suspensão por repulsão das cargas semelhantes entre as superfícies (MACHADO; MACHADO; SOUZA-SOARES, 2023).

Tabela 10. Concentrações de substância bioativa nos lipossomas preparados e valores corrigidos com eficiência de encapsulamento.

Composto	% Composto	Concentração teórica (mmol/L)	Eficiência de Encapsulamento	Concentração do fármaco encapsulada (mmol/L)
4	10%	1,00	99,47%	0,9947
6	10%	1,00	94,06%	0,9406
79	10%	1,00	94,64%	0,9464
80	10%	1,00	93,06%	0,9306

Fonte: Próprio autor.

As formulações empregadas apresentaram percentual de eficiência de encapsulamento (EE) entre 93,06% a 99,47% conforme visualizado na **Tabela 10**. A magnitude destes valores já era esperada já que, devido a característica de lipofilicidade dos compostos **4**, **6**, **79** e **80** esperava-se uma maior afinidade destes compostos pela parcela hidrofóbica representada pela adição de **SPC** e Colesterol (**COL**). Essa percepção pode reforçar inclusive que os ligantes podem encontrar-se dispersos na bicamada lipídica formada pelos lipossomas que é suplantado pelo contraste da fase aquosa e a hidrofobicidade dos ligantes empregados. De modo geral, uma EE próxima de 100% apresenta um cenário mais satisfatório já que não representa grandes perdas no processo de encapsulamento e diminui a necessidade de emprego de quantidades maiores do ligante no preparo destes sistemas lipossomais.

As soluções ao final do processo apresentaram-se com uma característica esbranquiçada e turva de aspecto leitoso. Durante os testes de

solubilidade, o principal fator que era observado nas tentativas era a persistência da presença de um precipitado na solução que indicava a falha do processo de solubilização. Contudo, com o emprego dos lipossomas não houve persistência desse precipitado, indicando um sucesso na solubilização através da aplicação de um sistema nanoestruturado com os lipossomas.

Além disso, o percentual de EE é um indicativo de sucesso do encapsulamento já que, a determinação envolve um processo de centrifugação das amostras em eppendorfs contendo filtros de poros de 10 KDa que retêm as partículas lipossomais durante a centrifugação. Como resultado, o meio aquoso passante da centrifugação, se apresentasse presença majoritária do ligante verificada pela determinação por espectrofotometria, indicaria falha parcial ou total do processo de encapsulamento. Tomando como base a EE no intervalo de 93,06% a 99,47%, o percentual passante médio das soluções medidas encontra-se abaixo de 10%, ou seja, a esmagadora maioria do que foi adicionado na formulação encontra-se encapsulada dentro nas partículas lipossomais. De modo associativo, é factível que uma maior quantidade deste ligante encontra-se disponível para entrega ao alvo a ser aplicado em futuros estudos.

4 METODOLOGIA

4.1 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM DOCAGEM MOLECULAR

4.1.1 Obtenção E Preparação Da Estrutura Tridimensional Do Alvo Molecular (HadAB)

Obteve-se a estrutura cristalográfica da enzima (3R)-hidroxiacil-ACP desidratase (complexo HadAB) de *Mycobacterium tuberculosis* no Banco de Dados de Proteínas (<http://www.rcsb.org>, PDB), disponibilizada pelo código 4RLT, com resolução de 2,05 Å, co-cristalizada com o ligante Fisetina (**FSE**).

A enzima foi previamente preparada no *software* Discovery Studio Visualizer (v.21.1.0.20298), mantendo-se os dímeros A e B. As moléculas de água (**HOH**) e de glicerol (**GOL**) foram removidas da estrutura tridimensional, exceto pelas moléculas de água que participavam do processo de reconhecimento molecular (**HOH330**, **HOH339**, **HOH434** e **HOH353**).

4.1.2 Preparação Dos Ligantes

As estruturas tridimensionais das moléculas de interesse foram construídas utilizando o programa ChemDraw e, em seguida, minimizou-se as energias das geometrias de entrada usando o campo de força MM2, implementado no programa ChemBio3D (versão 12.0, PerkinElmer Informatics). Os estereoisômeros, tautômeros e estados de protonação foram verificados em pH 7,4, utilizando-se o programa MarvinSketch (versão 22.7, Chemaxon). Os arquivos das estruturas otimizadas foram salvos no formato *.mol2, para serem utilizados na etapa de *docagem* molecular.

Todas as moléculas de interesse utilizadas no processo de triagem virtual estão demonstradas no Apêndice A.

4.1.3 Docagem Molecular

A docagem molecular foi realizada utilizando o programa GOLD

(*Genetic Optimization for Ligand Docking*, Cambridge Crystallographic Data Centre, versão 2020.1), utilizando as funções de pontuação disponíveis: GoldScore, ChemScore, ASP e ChemPLP. Os átomos de hidrogênio polares foram adicionados à proteína com base na ionização inferida pelo programa, o número de operações genéticas em cada execução e outros parâmetros foram definidos como padrão. As ligações rotacionáveis da proteína foram definidas como fixas. As águas selecionadas (HOH330, HOH339, HOH434 e HOH353) foram configuradas em relação a sua orientação e distância de interação ajustando a opção Toggle para “On”, Spin para “Trans spin” e Distance para 1Å.

A região de interesse do sítio ativo foi definida com base nas coordenadas do ligante fisetina (**FSE**), originalmente presente em $x = -1,147762$, $y = 22,863333$ e $z = -30,444619$. O local de ligação foi definido em raio de 15 Å para as análises no sítio ativo. Os ligantes foram configurados como flexíveis e foram submetidos a 10 execuções iterativas

A função de pontuação selecionada para o estudo completo de todos ligantes foi definida com base no cálculo de desvio quadrático médio (RMSD) através de procedimento conhecido como redocagem, do inglês “*redocking*”, realizado diretamente no programa GOLD. Após a validação por *redocagem*, os mesmos parâmetros foram aplicados para as moléculas de interesse.

As análises das soluções obtidas no procedimento de docagem molecular e a geração das imagens foram realizadas no programa Discovery Studio Visualizer (v.21.1.0.20298).

4.1.4 Previsões *In Silico* De Parâmetros De Fármaco-Similaridade

Após as simulações de *docagem* molecular, realizou-se predição dos parâmetros relacionados à semelhança com fármacos (fármaco-similaridade, ou do inglês *druglikeness*) e biodisponibilidade oral das substâncias selecionadas com o auxílio da plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>, SIB - Swiss Institute of Bioinformatics).

4.2 PREPARO DOS LIPOSSOMAS

O preparo dos lipossomas pelo emprego da técnica de hidratação do filme lipídico. Uma solução estoque de Fosfatidilcolina de Soja (**SPC**) foi preparada para concentração final de 0,075 mol/L e outra solução estoque de Colesterol (**COL**) para 0,078 mol/L. Ambas as soluções de lipídios foram preparadas utilizando-se CHCl_3 como solvente. As soluções estoques das drogas selecionadas (**4**, **6**, **79** e **80**) foram preparadas em DMSO para uma concentração final de 0,01 mol/L utilizando-se banho ultrassônico até que o conteúdo sólido fosse completamente solubilizado. Durante os preparos, as soluções estoque foram mantidas em congelador.

4.2.1 Preparo do filme lipídico e hidratação do filme – (**SPC** 0,075 mol/L e **COL** 0,078 mol/L mix 7:3)

Considerando uma proporção de 7:3 de **SPC:COL**, em um balão volumétrico, adicionou-se 9 μL da solução estoque de **SPC** e 4 μL da solução estoque de **COL**. O balão então foi levado ao rota-evaporador a vácuo até que todo o conteúdo líquido fosse evaporado restando apenas o filme aderido à superfície do balão. Logo após a evaporação, no mesmo balão, 0,9 mL de água destilada e 0,1 mL da solução estoque do composto sintetizado foram adicionados sobre o filme seco.

A solução resultante foi levada a um banho ultrassônico durante 15 min. Após o período de banho ultrassônico, a solução foi levada ao homogeneizador ultrassônico (QSonica, Q500) utilizando-se uma frequência de 20 kHz a 500W e 30% de amplitude em ciclos de 1 min de agitação e 1 min de descanso sob banho de gelo.

4.2.2 Caracterização dos Lipossomas

O tamanho médio e potencial zeta foram mensurados pela técnica de *DLS* (do inglês, *Dynamic Light Scattering*) no equipamento Litesizer 500, ANTON PAAR, em temperatura ambiente. As medidas foram realizadas a fim de obter ao menos 60% de transmitância utilizando-se 0,5 mL da solução de lipossoma previamente preparado e 0,5 mL de água ultrapura. As medições foram conduzidas em triplicata.

4.2.3 Doseamento do fármaco

4.2.3.1 Espectro de varredura dos ligantes.

Para o doseamento do fármaco livre a metodologia empregada considerou a técnica de espectrofotometria UV-Vis com soluções de fármaco solubilizadas em uma matriz 1:1 Água/DMSO e concentração final de 50 $\mu\text{mol/L}$. Para a aplicação deste método, os espectros de absorção foram obtidos por varredura nos comprimentos de onda (λ) 250 nm a 500 nm. Com os espectros de varredura, o λ máximo era definido para a construção das curvas de calibração como sendo o ponto de maior absorção. Os espectros podem ser verificados no Apêndice C.

4.2.3.2 Curvas de calibração.

Com os λ máximos definidos para cada fármaco, as curvas foram construídas considerando-se um número mínimo de cinco pontos visando-se a obtenção de um coeficiente de correlação (R^2) mínimo de 0,95 (95%). A equação da reta obtida pela curva de calibração era então empregada para a determinação do fármaco a ser doseado pelo método dos mínimos quadrados.

$$y = ax + b$$

Sendo:

x , variável resposta a ser obtida, no caso, a concentração resposta da solução medida;

a , coeficiente angular da reta;

b , coeficiente linear da reta;

y , valor da absorbância medida.

As soluções foram preparadas considerando uma matriz composta por DMSO:Água na razão 1:1 de volume final 1 mL. As concentrações das soluções empregadas na curva de calibração podem ser verificadas na tabela a seguir:

Tabela 11. Concentração dos pontos utilizados para construção das curvas de calibração para cada composto e respectivos coeficientes de correlação.

Concentração dos compostos nos pontos em mol/L.				
Ponto	4	6	79	80
1	0,0000050	0,0000050	0,0000050	0,0000025
2	0,0000100	0,0000100	0,0000100	0,0000050
3	0,0000150	0,0000150	0,0000150	0,0000100
4	0,0000200	0,0000300	0,0000200	0,0000150
5	0,0000250	0,0000430	0,0000250	0,0000200
6	0,0000300	-	0,0000300	0,0000250
7	0,0000430	-	0,0000430	0,0000300
8	-	-	-	0,0000430
R²	0,994	0,980	0,997	0,997

Fonte: Próprio autor.

4.2.4 Eficiência de encapsulamento (EE)

A eficiência de encapsulamento era determinada após um processo de centrifugação que ocorreu levando-se 0,4 mL do lipossoma preparado a um eppendorf contendo um filtro de 10 KDa. A amostra era então centrifugada por uma hora obtendo-se ao final uma solução passante que era posteriormente diluída considerando-se uma mistura 1:1 Água/DMSO. No caso, como a composição majoritária dessa solução passante se tratava de água, 0,2 mL eram adicionados em um eppendorf separado que eram diluídos pela adição de 0,2 mL de DMSO. A solução final diluída era então submetida a leitura em UV-Vis.

Com os resultados das leituras, utilizava-se a equação da reta descrita no item 4.2.3.2 para determinação da concentração presente na solução diluída (fator de diluição de 2x). Esse valor, considerando o processo de diluição, era corrigido para se obter ao final a concentração de fármaco passante livre em solução. A partir dessa informação, aplicava-se a seguinte fórmula para obtenção do percentual de EE:

$$EE = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

Sendo:

EE, eficiência de encapsulamento em porcentagem;

C_i, concentração inicial, no caso, concentração teórica do lipossoma;

C_f, concentração final, no caso, concentração prática após correção baseada na concentração do passante.

5 CONCLUSÃO

As observações sobre os modos de ação destes ligantes foram relatados no trabalho “***Mycobacterial Targets for Thiourea Derivatives: Opportunities for Virtual Screening in Tuberculosis Drug Discovery***” publicado na revista *Current Medicinal Chemistry* em 16 de fevereiro de 2024.

As observações acerca dos padrões de interação fornecidas pelos diagramas, revelaram aspectos semelhantes de interação com resíduos importantes destacados. Os complexos com melhor FS de avaliação referentes às substâncias **4**, **6**, **79**, e **80** apresentaram interações importantes com os resíduos da díade catalítica Asp36 (B) e His41(B).

As interações hidrofóbicas observadas podem suplantar os valores de FS obtidos uma vez que os resíduos de revestimento do canal presente no heterodímero HadA estiveram presentes nos diagramas de interação sinalizados como interações de Van der Waals, empilhamento π , π - π e π -S. Essas interações podem sugerir comportamento satisfatório do ponto de vista de complementariedade do alvo molecular pelo ligante avaliado.

Os parâmetros de fármaco-similaridade revelaram apenas uma violação de Lipinski, sendo ela relacionada a substância **4**. Em contrapartida com o que foi observado, uma violação foi constatada no valor de logP para **ISO**, porém, não foi observada para os demais ligantes. No entanto, considerando o histórico de **ISO**, o conjunto destes resultados revela uma observação otimista para os ligantes, que podem possuir características mais adequadas de biodisponibilidade.

A semelhança da característica hidrofóbica entre ligantes e lipídios empregados foi determinante em conferir uma alta EE devido fatores discutidos anteriormente. Tal fato torna-se satisfatório considerando possíveis aplicações práticas que não exigem utilização de uma quantidade grande de substância bioativa para emprego das formulações.

Dado a característica dos ligantes avaliados, que derivam dos parâmetros observados para **ISO**, propriedades físico-químicas podem exercer influência negativa frente a eventuais experimentos *in vitro*. Nesse contexto, sistemas de liberação de fármacos podem auxiliar como formas alternativas para contorno dos problemas identificados e relacionados a tais observações. Os lipossomas foram bem-sucedidos em resolver a problemática de solubilidade das tioureias selecionadas e

poderão ser direcionadas para as próximas etapas de teste *in vitro* uma vez que encapsulados, podem ser veiculados em meios aquosos durante os testes.

REFERÊNCIAS

- ADLER-MOORE, JILL.; GAMBLE, R. C.; PROFITT, R. T. **Treatment of Systemic Fungal Infections with Phospholipid Particles Encapsulating Polyene Antibiotics**. United States of America U.S. Patent, , 23 fev. 1999.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818–1822, 19 mar. 2004.
- BARBERIS, I. et al. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 58, n. 1, p. E9–E12, mar. 2017.
- BERGMAN, D. L.; LAAKSONEN, L.; LAAKSONEN, A. Visualization of solvation structures in liquid mixtures. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 15, n. 5, p. 301–306, out. 1997.
- BIBENS, L. et al. A Review of Fatty Acid Biosynthesis Enzyme Inhibitors as Promising Antimicrobial Drugs. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, p. 425, 10 mar. 2023.
- BRASIL. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: [s.n.].
- BRASIL. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose - Número Especial | Mar. 2024**.
- BRITO, T. O. et al. Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 93–103, 16 jan. 2020.
- CAREL, C. et al. Mycobacterium tuberculosis Proteins Involved in Mycolic Acid Synthesis and Transport Localize Dynamically to the Old Growing Pole and Septum. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97148, 9 maio 2014.
- CDC, C. FOR D. C. **The Difference Between Latent TB Infection and TB Disease**.
- CDC, C. FOR D. C. **History of World TB Day**.
- CHEPLAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH. **Visudyne**. Germany European Medicines Agency (EMA), , 27 jul. 2000.
- CLARK, K. P.; AJAY. Flexible ligand docking without parameter adjustment across four ligand–receptor complexes. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 1210–1226, 7 out. 1995.
- CLAUDE GARCON, N. M.-J.; FRIEDE, M. **Vaccines Containing a Saponin And a Sterol**. Belgium Glaxosmithkline, , 29 set. 2005.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 3 mar. 2017.
- DONG, Y. et al. Molecular basis for the inhibition of β -hydroxyacyl-ACP dehydratase

HadAB complex from mycobacterium tuberculosis by flavonoid inhibitors. **Protein and Cell**, v. 6, n. 7, p. 504–517, 1 jul. 2015a.

DONG, Y. et al. Molecular basis for the inhibition of β -hydroxyacyl-ACP dehydratase HadAB complex from *Mycobacterium tuberculosis* by flavonoid inhibitors. **Protein & Cell**, v. 6, n. 7, p. 504–517, 17 jul. 2015b.

DONG, Y. et al. Expression, purification and crystallization of the (3R)-hydroxyacyl-ACP dehydratase HadAB complex from *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Expression and Purification**, v. 114, p. 115–120, out. 2015c.

GAO, L. Y. et al. Requirement for kasB in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: Implications for therapy. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1547–1563, set. 2003.

GRZEGORZEWICZ, A. E. et al. Covalent Modification of the *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II Dehydratase by Isoxyl and Thiacetazone. **ACS Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 91–97, 13 fev. 2015a.

GRZEGORZEWICZ, A. E. et al. Covalent Modification of the *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II Dehydratase by Isoxyl and Thiacetazone. **ACS Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 91–97, 13 fev. 2015b.

GRZEGORZEWICZ, A. E. et al. Mechanisms of Resistance Associated with the Inhibition of the Dehydration Step of Type II Fatty Acid Synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 195–204, 14 fev. 2020.

HEEMSKERK, D. et al. **Tuberculosis in Adults and Children**. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 2

HOLZHEIMER, M.; BUTER, J.; MINNAARD, A. J. Chemical Synthesis of Cell Wall Constituents of *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 15, p. 9554–9643, 11 ago. 2021.

KALÉ, L. et al. NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. **Journal of Computational Physics**, v. 151, n. 1, p. 283–312, maio 1999.

KHUTLANG, R. et al. Classification of *Mycobacterium tuberculosis* in images of ZN-stained sputum smears. **IEEE transactions on information technology in biomedicine: a publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**, v. 14, n. 4, p. 949–57, jul. 2010.

KORDULÁKOVÁ, J. et al. Isoxyl Activation Is Required for Bacteriostatic Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3824–3829, nov. 2007.

LAAKSONEN, L. A graphics program for the analysis and display of molecular dynamics trajectories. **Journal of Molecular Graphics**, v. 10, n. 1, p. 33–34, mar. 1992.

LABONTE, J. W.; TOWNSEND, C. A. Active site comparisons and catalytic mechanisms of the hot dog superfamily. **Chemical Reviews**, 13 mar. 2013.

LABORDE, J.; DERAEEVE, C.; BERNARDES-GÉNISSON, V. Update of Antitubercular Prodrugs from a Molecular Perspective: Mechanisms of Action, Bioactivation Pathways, and Associated Resistance. **ChemMedChem**, v. 12, n. 20, p. 1657–1676, 20 out. 2017.

LACATUSU, I. et al. Novel bio-active lipid nanocarriers for the stabilization and sustained release of sitosterol. **Nanotechnology**, v. 23, n. 45, p. 455702, 16 nov. 2012.

LEE, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 78, n. 2, p. 47–55, abr. 2015.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, mar. 2001.

LIU, P.; CHEN, G.; ZHANG, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1372, 17 fev. 2022.

LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 543, 28 fev. 2022a.

LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 543, 28 fev. 2022b.

MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 9, p. 1686–1701, 25 set. 2015.

MACHADO, A. R. et al. Liposomes loaded with phenolic extracts of Spirulina LEB-18: Physicochemical characterization and behavior under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 120, p. 656–667, jun. 2019.

MACHADO, A. R.; MACHADO, M. I. R.; SOUZA-SOARES, L. A. DE. Avaliação do tamanho de partículas lipossômicas em diferentes ensaios. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, p. e24512135104, 10 jan. 2023.

MAIA, E. H. B. et al. Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 28 abr. 2020.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 1 jun. 2011.

MILANI, V. DE M. et al. Mycobacterial Targets for Thiourea Derivatives: Opportunities for Virtual Screening in Tuberculosis Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 31, 16 fev. 2024.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and

an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 15 nov. 1998.

NOBBMANN, U. **Intensity-Volume-Number: Which size is correct?**

NSAIRAT, H. et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. **Heliyon**, v. 8, n. 5, p. e09394, maio 2022.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10938–10966, 14 out. 2015.

PHETSUKSIRI, B. et al. Antimycobacterial Activities of Isoxyl and New Derivatives through the Inhibition of Mycolic Acid Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1042–1051, maio 1999a.

PHETSUKSIRI, B. et al. Antimycobacterial Activities of Isoxyl and New Derivatives through the Inhibition of Mycolic Acid Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1042–1051, maio 1999b.

PHETSUKSIRI, B. et al. Antimycobacterial Activities of Isoxyl and New Derivatives through the Inhibition of Mycolic Acid Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1042–1051, maio 1999c.

PRATI, F. et al. Screening of a Novel Fragment Library with Functional Complexity against *Mycobacterium tuberculosis* InhA. **ChemMedChem**, v. 13, n. 7, p. 672–677, 6 abr. 2018.

PYM, A. S.; SAINT-JOANIS, B.; COLE, S. T. Effect of katG mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. **Infection and immunity**, v. 70, n. 9, p. 4955–60, set. 2002.

REDDY, N. S. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Urea and hiourea Derivatives at C-8 Alkyl Chain of Anacardic Acid Mixture Isolated from a Natural Product Cashew Nut Shell Liquid (CNSL). **International Journal of Organic Chemistry**, v. 01, n. 04, p. 167–175, 2011.

REGO, Y. F. et al. A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 69–100, set. 2018.

RENDON, A. et al. Classification of drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): evidence and perspectives. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, n. 10, p. 2666–2671, out. 2016.

RUTGERS UNIVERSITY. **Global TB Center - History Of Tuberculosis.**

SACCO, E. et al. **The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/content/full/>.

SINGH, V. et al. 1,3-Diarylpyrazolyl-acylsulfonamides Target HadAB/BC Complex in *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 2315–2326, 11

nov. 2022.

TAYLOR, J. S.; BURNETT, R. M. DARWIN: a program for docking flexible molecules. **Proteins**, v. 41, n. 2, p. 173–91, 1 nov. 2000.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145–160, fev. 2005.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 1 jun. 2002.

VERDONK, M. L. et al. Modeling Water Molecules in Protein–Ligand Docking Using GOLD. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 20, p. 6504–6515, 1 out. 2005.

WANG, C.; HICKEY, A. J. Isoxyl Aerosols for Tuberculosis Treatment: Preparation and Characterization of Particles. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 538–549, 26 jun. 2010a.

WANG, C.; HICKEY, A. J. Isoxyl particles for pulmonary delivery: In vitro cytotoxicity and potency. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, n. 1–2, p. 99–104, 30 ago. 2010b.

WANG, N.; CHEN, M.; WANG, T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization. **Journal of Controlled Release**, v. 303, p. 130–150, jun. 2019.

WHO. **WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 4: Treatment Drug-susceptible Tuberculosis Treatment**. Geneva: [s.n.].

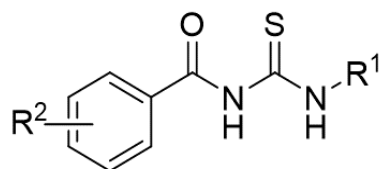
WHO. **Global Tuberculosis Report 2023**. Geneva: [s.n.].

ZHANG, H.; MACHUTTA, C. A.; TONGE, P. J. Fatty Acid Biosynthesis and Oxidation. Em: **Comprehensive Natural Products II**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 231–275.

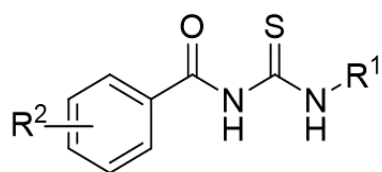
APÊNDICES

APÊNDICE A – ESTRUTURAS APRESENTADAS NO TRABALHO.

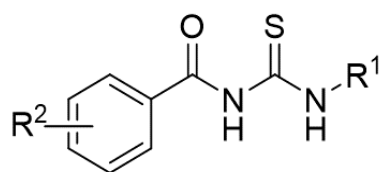
Tabela 1. Benzoiltioureias avaliadas dentro do estudo de triagem virtual.



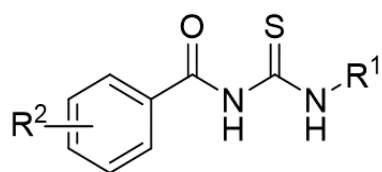
Tioureia	R ¹	R ²
1	Ph	H
2	i-Bu	H
3	Bn	H
4	Ph-(Bis4)	H
5	4-OMePh	H
6	Ph-4-NHSCNHCOPh	H
7	H	H
8	2-BrPh	H
9	~CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	H
10	3-BrPh	H
11	2-ClPh	H
12	3-ClPh	H
13	4-FPh	H
14	4-SCH ₃ Ph~	H
15	Py	H
16	Pirimidina	H
17	3-OHPh	H
18	CH ₃	H



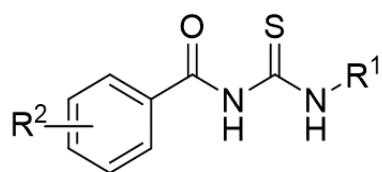
Tiourea	R ¹	R ²
19	Et	H
20	PhCH ₃	H
21	4-OMePh	4-NO ₂
22	4-OHPh	4-NO ₂
23	4-NO ₂ Ph	4-NO ₂
24	Ph	4-NO ₂
25	Bn	4-NO ₂
26	Ph	3-NO ₂
27	4-OMePh	3-NO ₂
28	4-OHPh	3-NO ₂
29	4-NO ₂ Ph	3-NO ₂
30	Bn	3-NO ₂
31	Ph	2-NO ₂
32	4-ClPh	2-NO ₂
33	4-NO ₂ Ph	2-NO ₂
34	4-OMePh	2-NO ₂
35	4-OHPh	2-NO ₂
36	Bn	2-NO ₂
37	Ph	4-Cl
38	4-OMePh	4-Cl



Tiourea	R ¹	R ²
39	4-NO ₂ Ph	4-Cl
40	Bn	4-Cl
41	4-OHPh	4-Cl
42	Ph	3-Cl
43	4-ClPh	3-Cl
44	4-NO ₂ Ph	3-Cl
45	4-OMePh	3-Cl
46	4-OHPh	3-Cl
47	Bn	3-Cl
48	Ph	2-Cl
49	4-ClPh	2-Cl
50	4-NO ₂ Ph	2-Cl
51	4-OMePh	2-Cl
52	4-OHPh	2-Cl
53	Bn	2-Cl
54	Ph	4-OMe
55	Bn	4-OMe
56	4-NO ₂ Ph	4-OMe
57	4-OMePh	4-OMe
58	4-OHPh	4-OMe



Tiourea	R ¹	R ²
59	Ph	3-OMe
60	4-OMePh	3-OMe
61	4-ClPh	3-OMe
62	Bn	3-OMe
63	4-OHPh	3-OMe
64	4-NO ₂ Ph	3-OMe
65	Ph	2-OMe
66	4-ClPh	2-OMe
67	4-OMePh	2-OMe
68	4-NO ₂ Ph	2-OMe
69	4-OHPh	2-OMe
70	Bn	2-OMe
71	Piperidina	H
72	4-BrPh	3-Cl
73	4-BrPh	2-Cl
74	4-BrPh	4-OMe
75	4-BrPh	3-OMe
76	4-BrPh	2-OMe
77	4-BrPh	4-NO ₂
78	4-BrPh	2-NO ₂



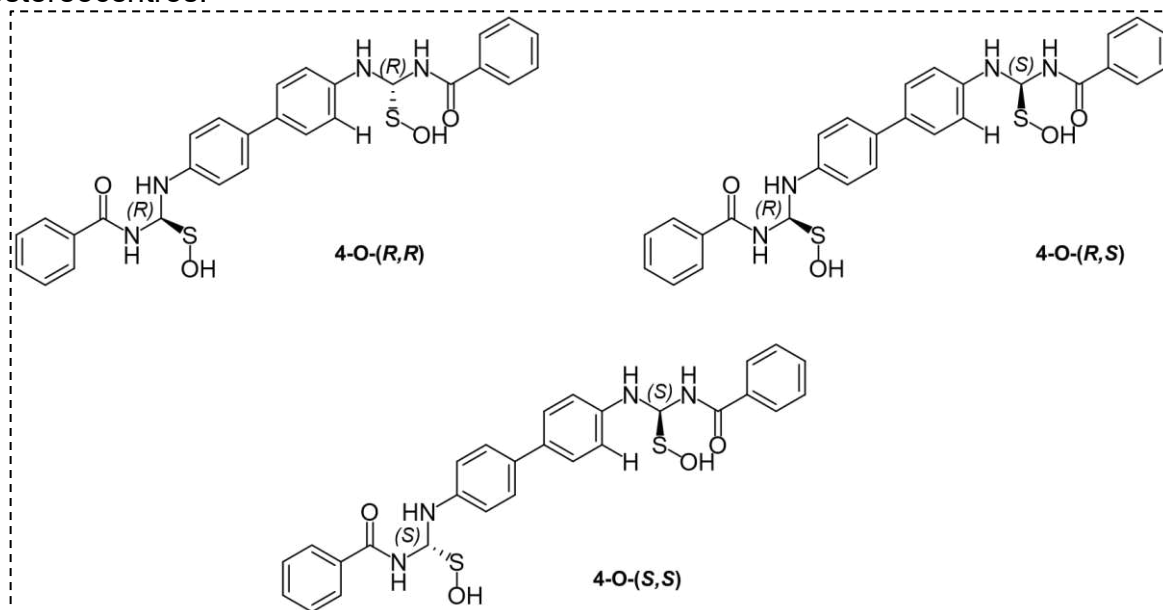
Tiourea	R ¹	R ²
79	4-t-BuPh	4-OMe
80	4-t-BuPh	3-OMe
81	4-t-BuPh	2-OMe
82	4-t-BuPh	4-Cl
83	4-t-BuPh	3-NO ₂
84	4-t-BuPh	2-NO ₂
85	4-ClPh	2,4-Cl
86	4-ClPh	3-NO ₂ , 4-Cl
87	4-NO ₂ Ph	H
88	4-OHPh	3-NO ₂
89	3-NO ₂ Ph	H
90	2-NO ₂ Ph	H

Fonte: Próprio autor.

Tabela 2. Benzoiltiureias derivadas do ácido cinâmico avaliadas no estudo.

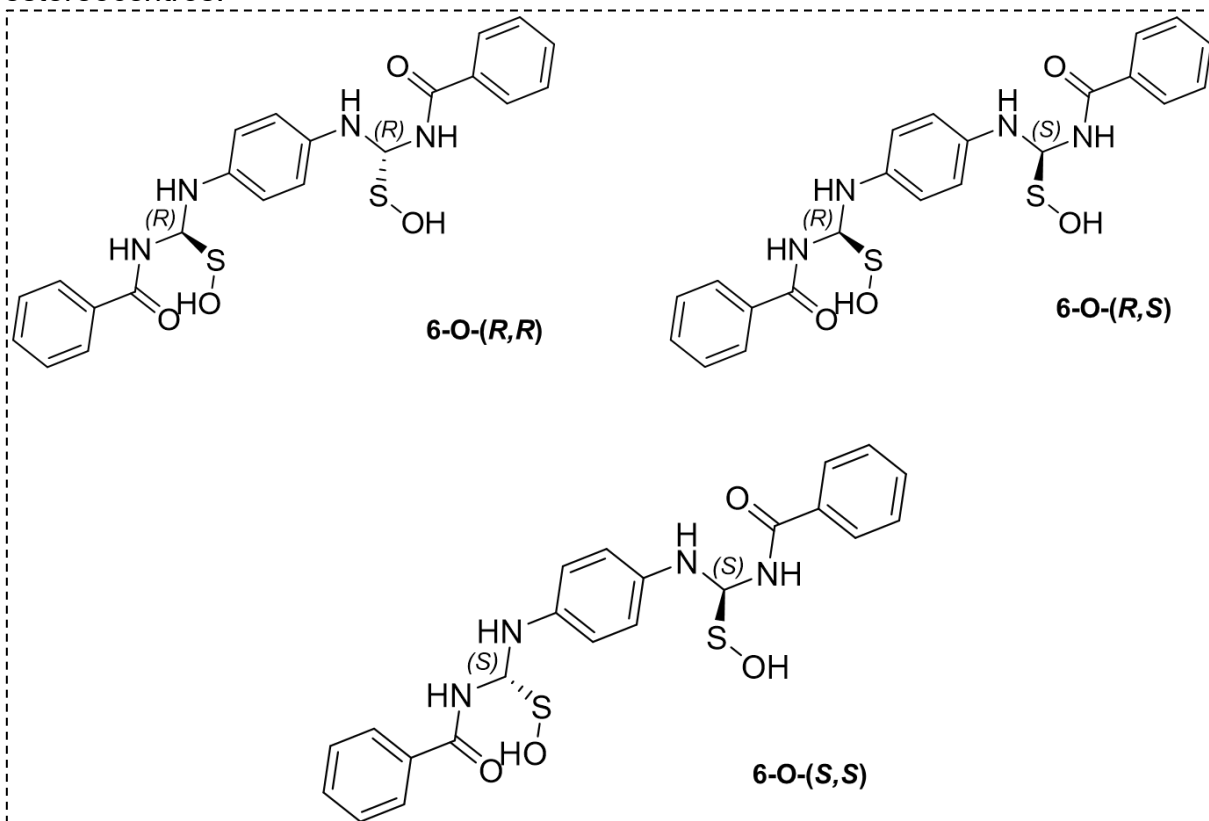
Tioureia	R ¹	R ²
91	Me	H
92	Et	H
93	Bu	H
94	Hex	H
95	H	H
96	Ph	H
97	4-OMe-Ph	H
98	4-F-Ph	H
99	4-Me-Ph	H

Fonte: Próprio autor.

Figura 1. Ácidos sulfênicos da bisbenzoiltioureia **4** selecionada e configurações dos estereocentros.

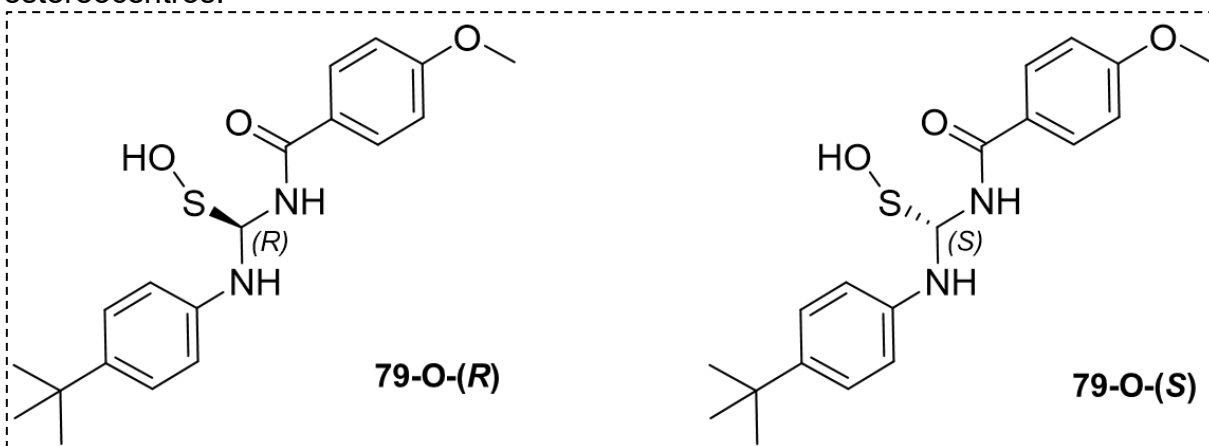
Fonte: Próprio autor.

Figura 2. Ácidos sulfênicos da bis-benzoiltiureia **6** selecionada e configurações dos estereocentros.



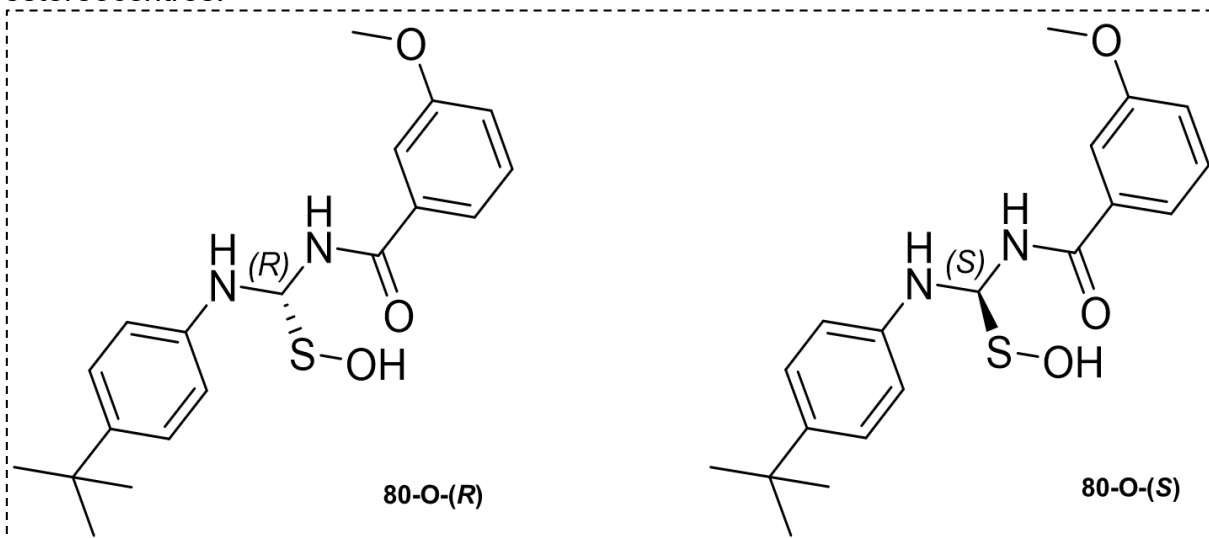
Fonte: Próprio autor.

Figura 3. Ácidos sulfênicos da benzoiltiureia **79** selecionada e configurações dos estereocentros.



Fonte: Próprio autor.

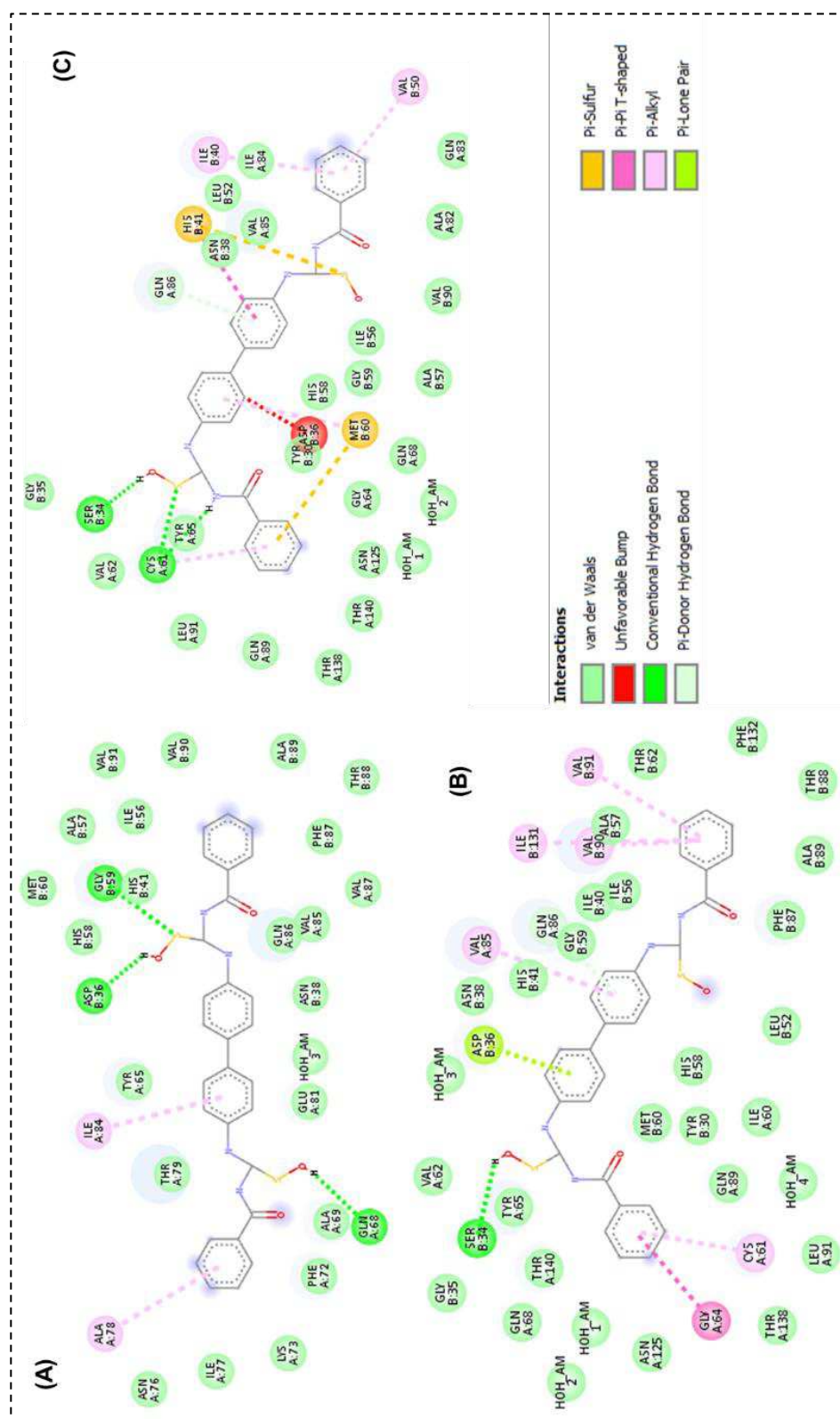
Figura 4. Ácidos sulfênicos da benzoiltiureia **80** selecionada e configurações dos estereocentros.



Fonte: Próprio autor.

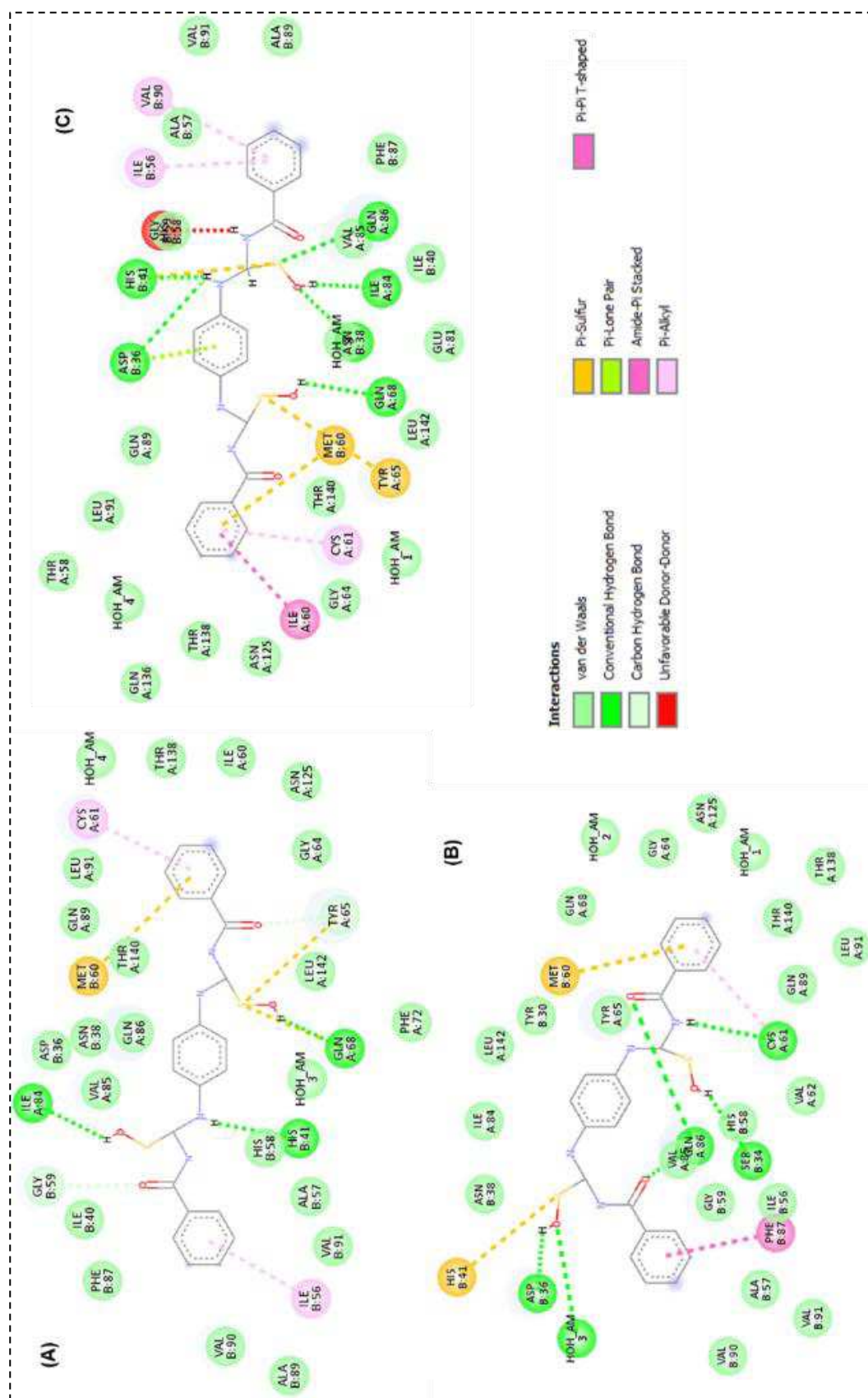
APÊNDICE B – DIAGRAMAS DE INTERAÇÃO DOS LIGANTES SELECIONADOS.

Figura 1. Diagramas observados para os estereoisômeros da estrutura do ligante 4.



Fonte: Próprio autor. Legendas: (A) Diagrama de interações para o estereoisômero 4 (R,R) (B) Diagrama de Interações para o estereoisômero (S,S) (C) Diagrama de interações para o estereoisômero (R,S). Os tipos de interações recebem cores específicas para diferenciação.

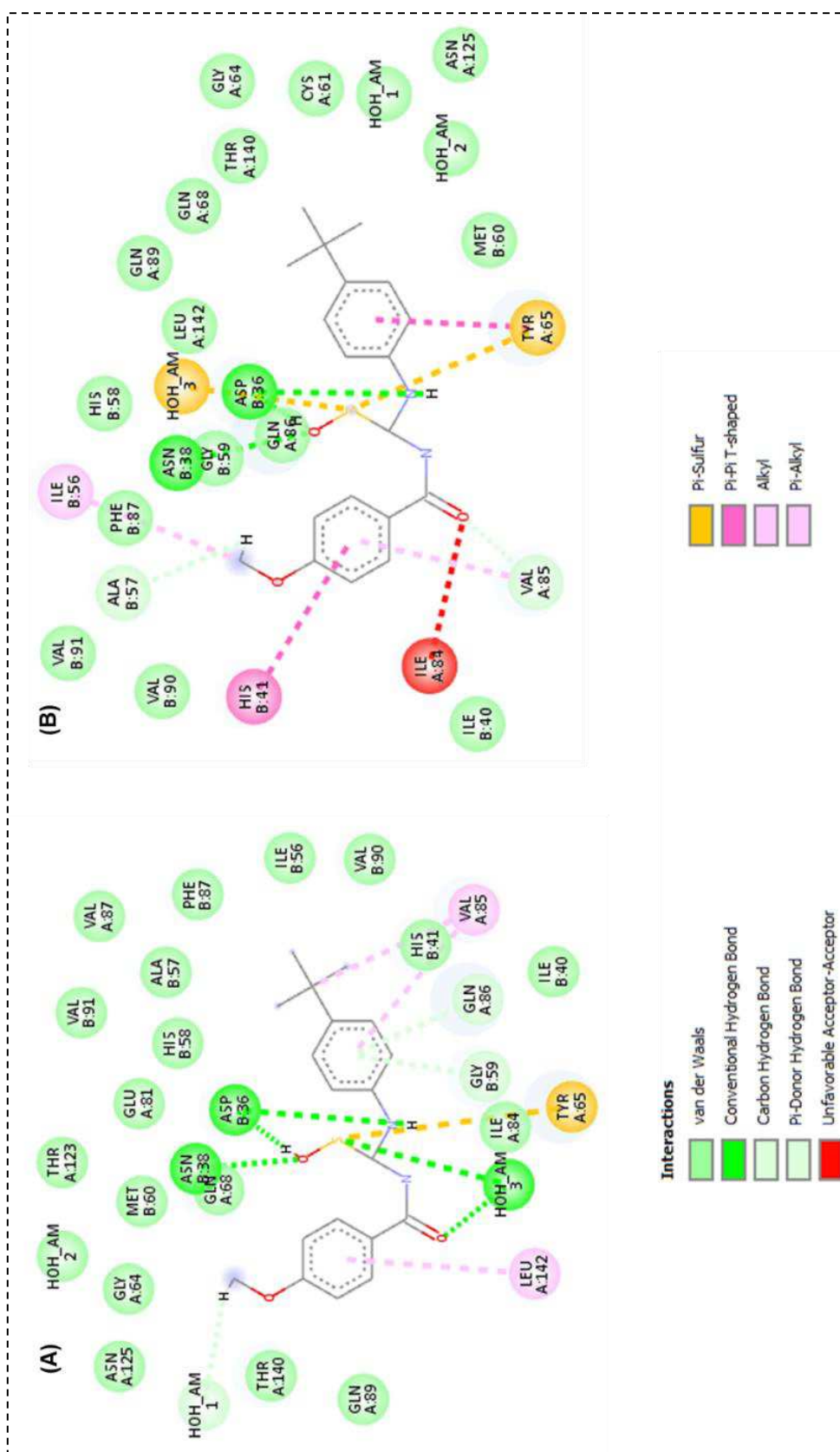
Figura 2. Diagramas observados para os estereoisômeros da estrutura do ligante 6.



Fonte: Próprio autor. Legendas: (A) Diagrama de interações do estereoisômero (S,S); (B) Diagrama de interações do estereoisômero (R,S) e; (C) Diagrama de interações do estereoisômero (R,R). Os tipos de interação recebem cores específicas para diferenciação.

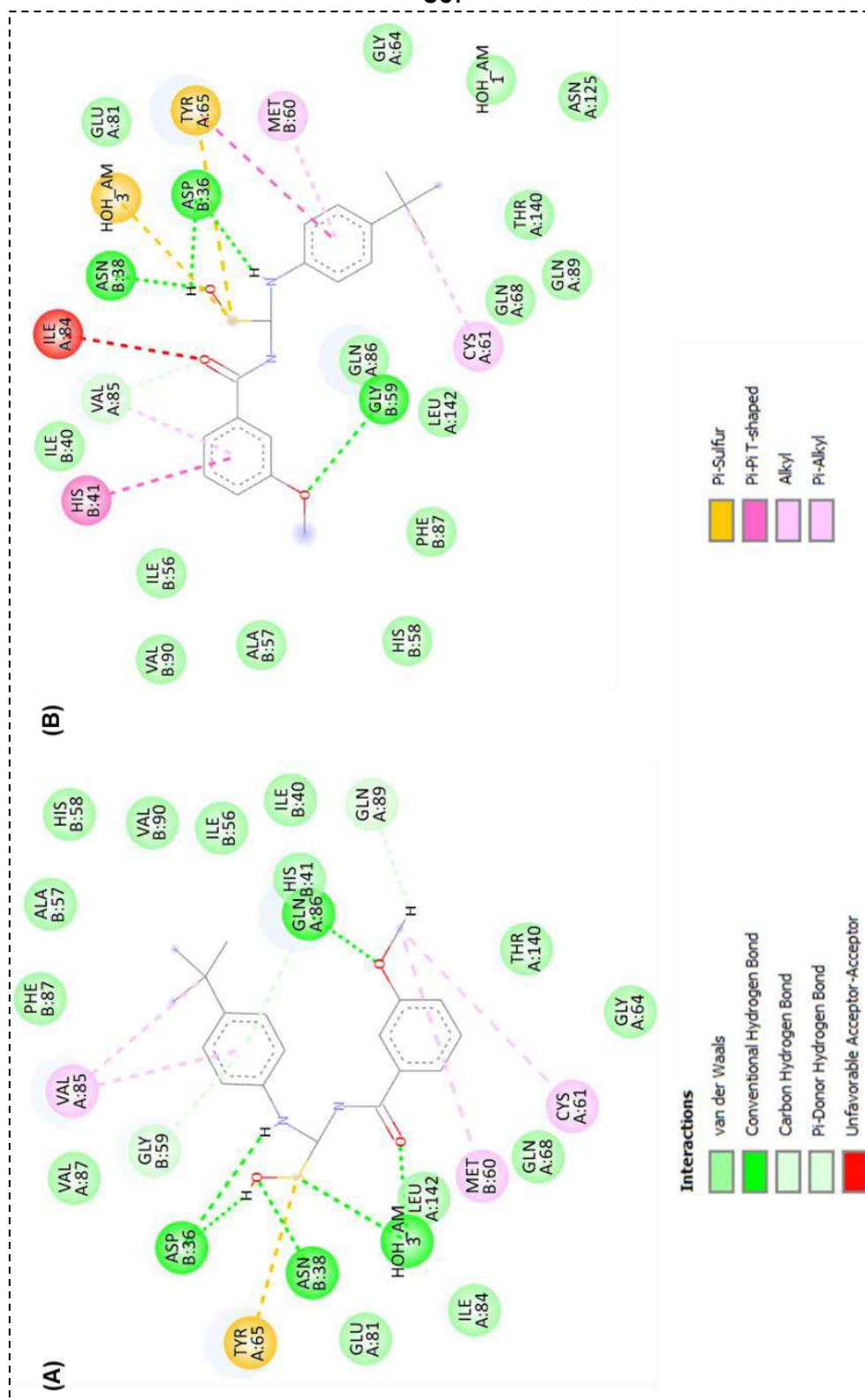
Figura 14. Diagramas observados para os estereoisômeros da estrutura do ligante

79.



Fonte: Próprio autor. Legendas: (A) Diagrama de interações do enantiômero (R) e (B) Diagrama de interações do enantiômero (S). Os tipos de interação recebem cores específicas para diferenciação.

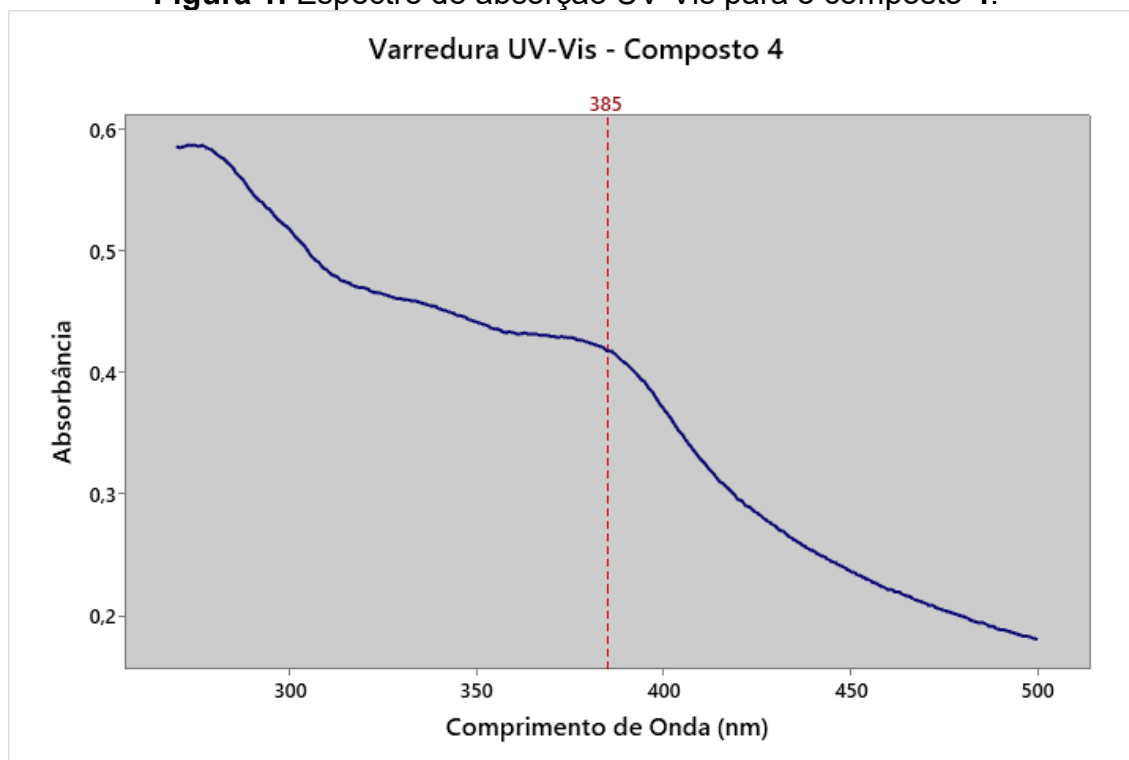
Figura 15. Diagramas observados para os estereoisômeros da estrutura do ligante 80.



Fonte: Próprio autor. Legendas: (A) Diagrama de interações do enantiômero (R) e (B) Diagrama de interações do enantiômero (S). Os tipos de interação recebem cores específicas para diferenciação.

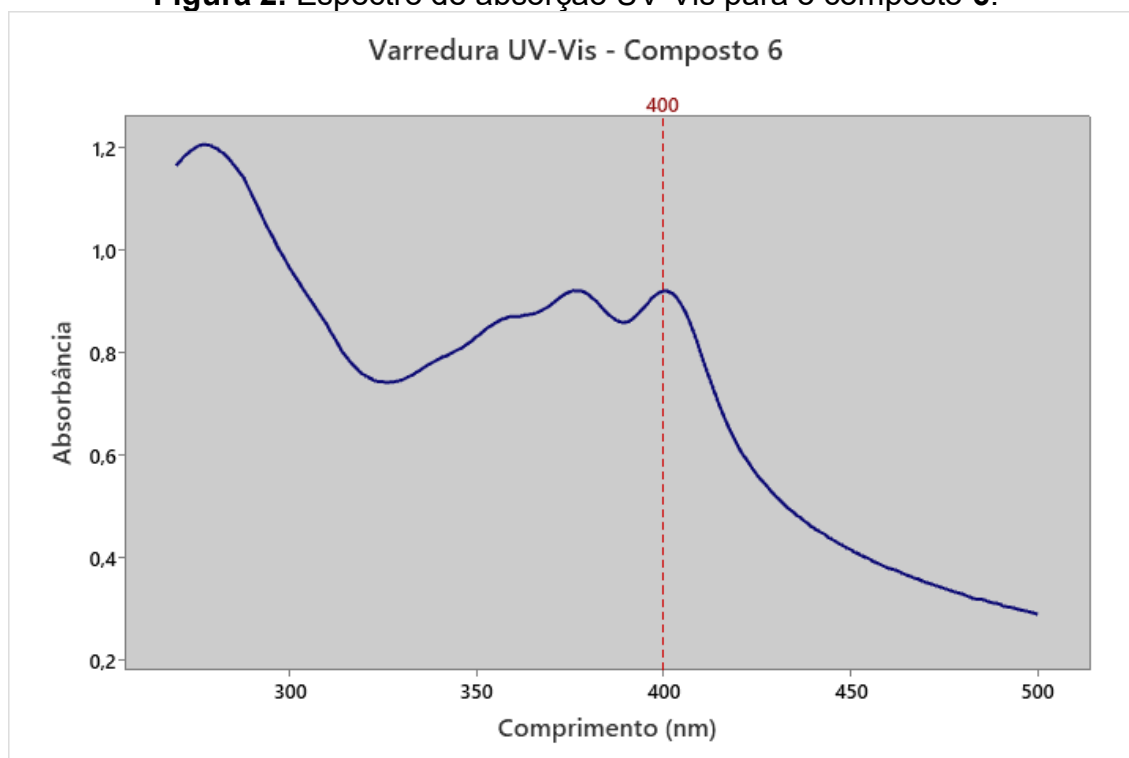
APÊNDICE C – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS E CURVAS DE CALIBRAÇÃO.

Figura 1. Espectro de absorção UV-Vis para o composto **4**.

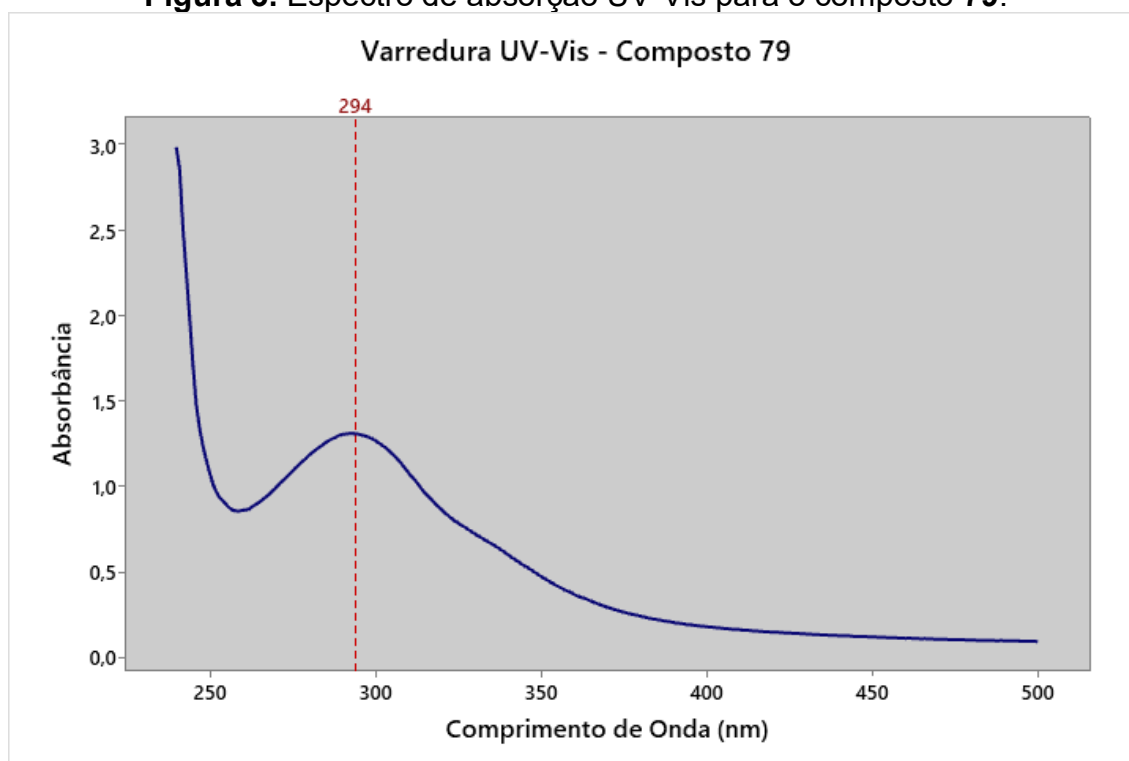


Fonte: Próprio autor.

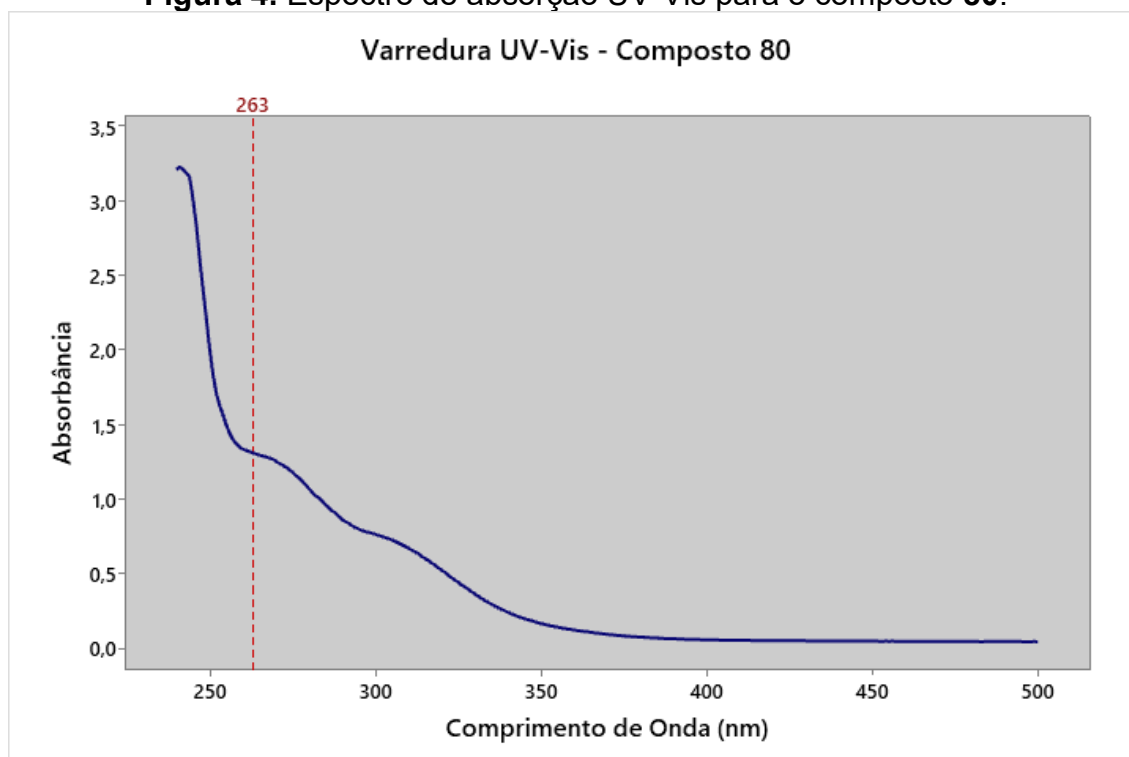
Figura 2. Espectro de absorção UV-Vis para o composto **6**.



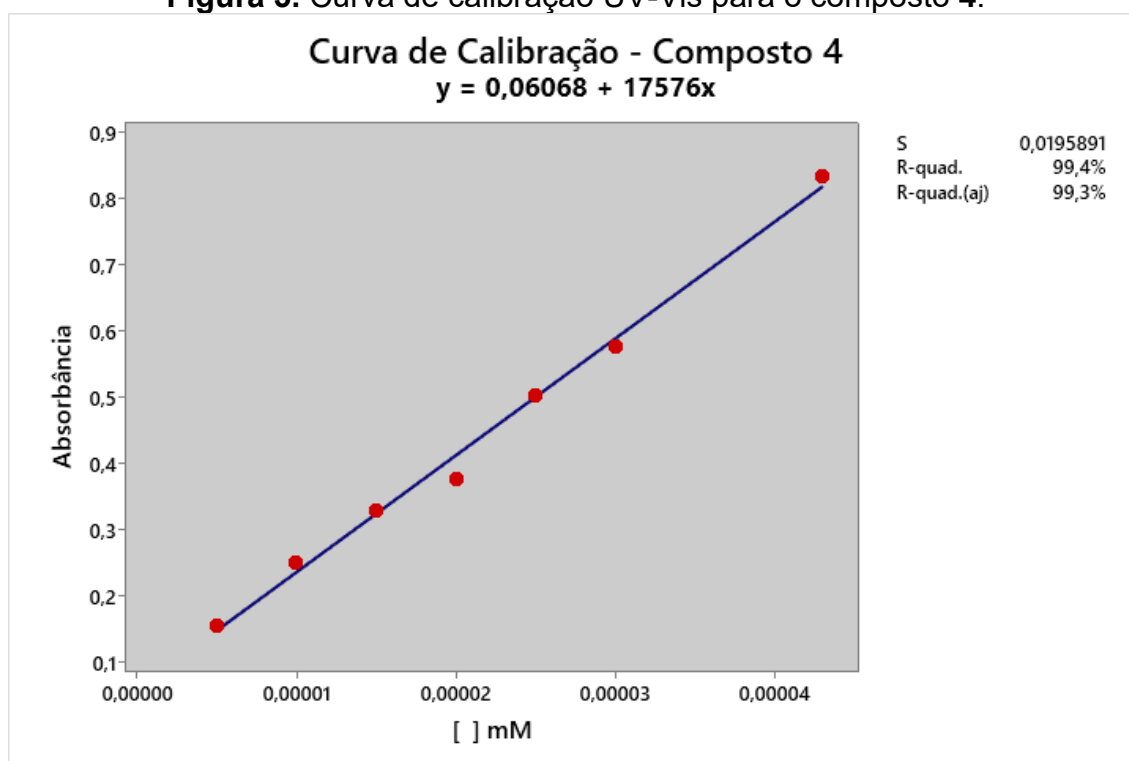
Fonte: Próprio autor.

Figura 3. Espectro de absorção UV-Vis para o composto **79**.

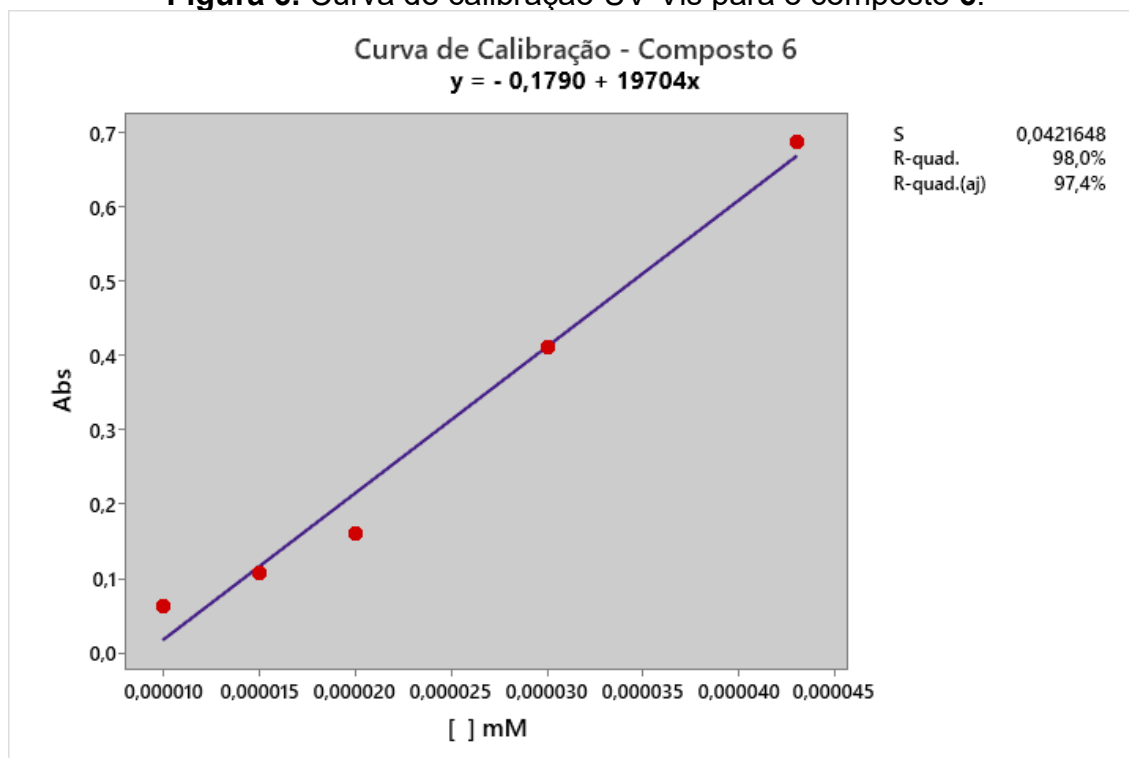
Fonte: Próprio autor.

Figura 4. Espectro de absorção UV-Vis para o composto **80**.

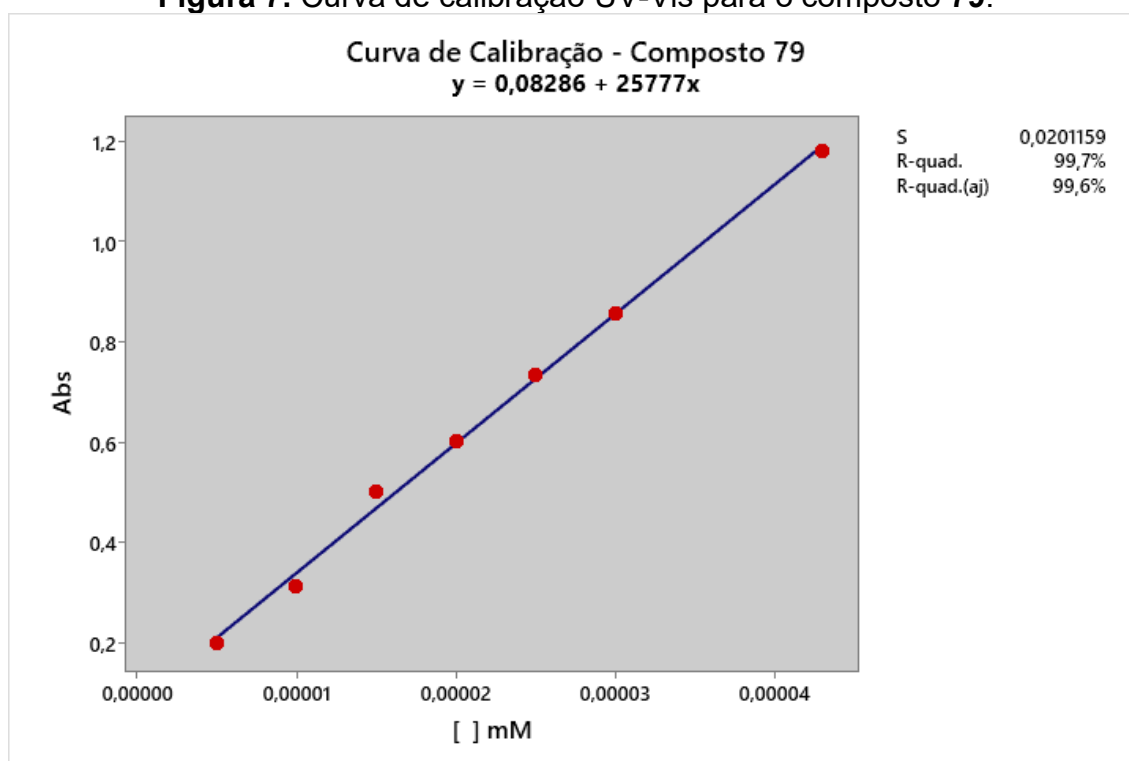
Fonte: Próprio autor.

Figura 5. Curva de calibração UV-Vis para o composto 4.

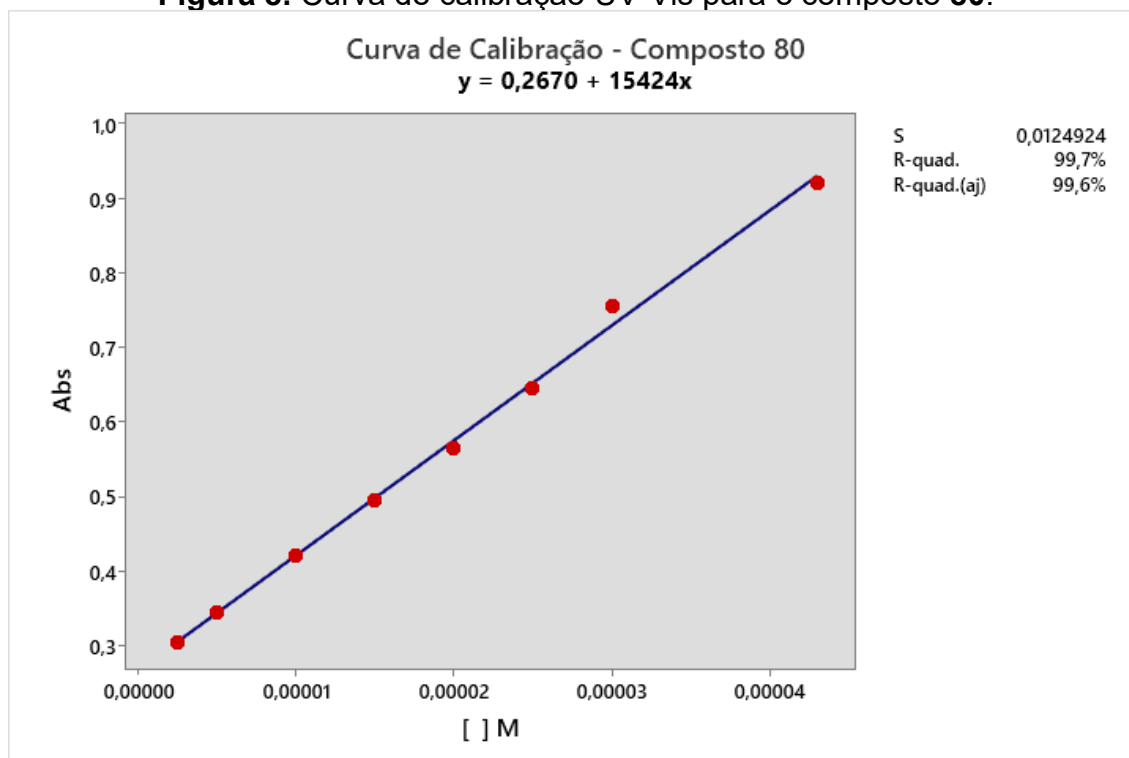
Fonte: Próprio autor.

Figura 6. Curva de calibração UV-Vis para o composto 6.

Fonte: Próprio autor.

Figura 7. Curva de calibração UV-Vis para o composto **79**.

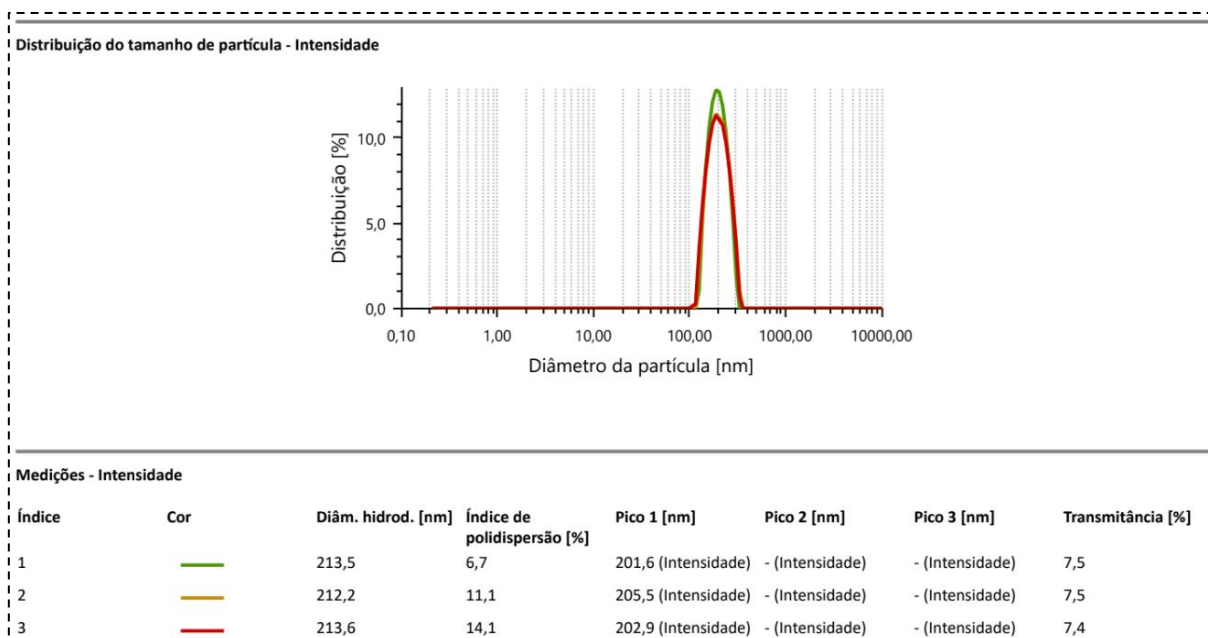
Fonte: Próprio autor.

Figura 8. Curva de calibração UV-Vis para o composto **80**.

Fonte: Próprio autor.

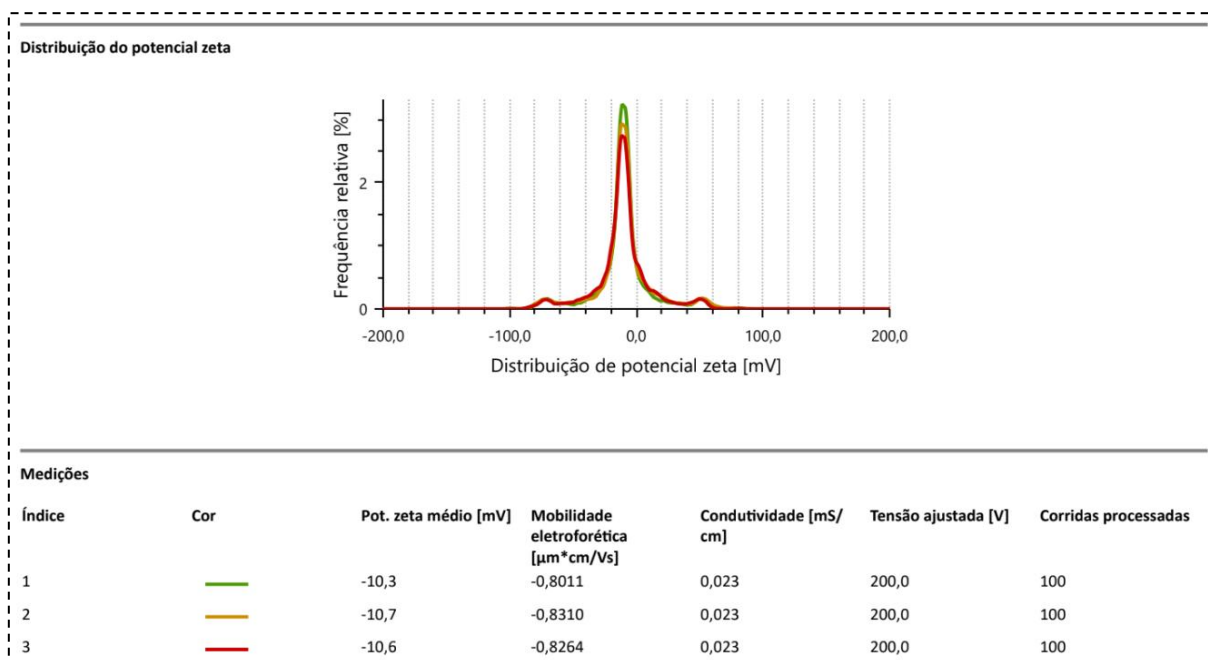
APÊNDICE D – RESULTADOS DE DLS E POTENCIAL ZETA PARA AS FORMULAÇÕES CONSTRUÍDAS.

Figura 1. Tamanho e índice de polidispersão do lipossoma do composto 4.

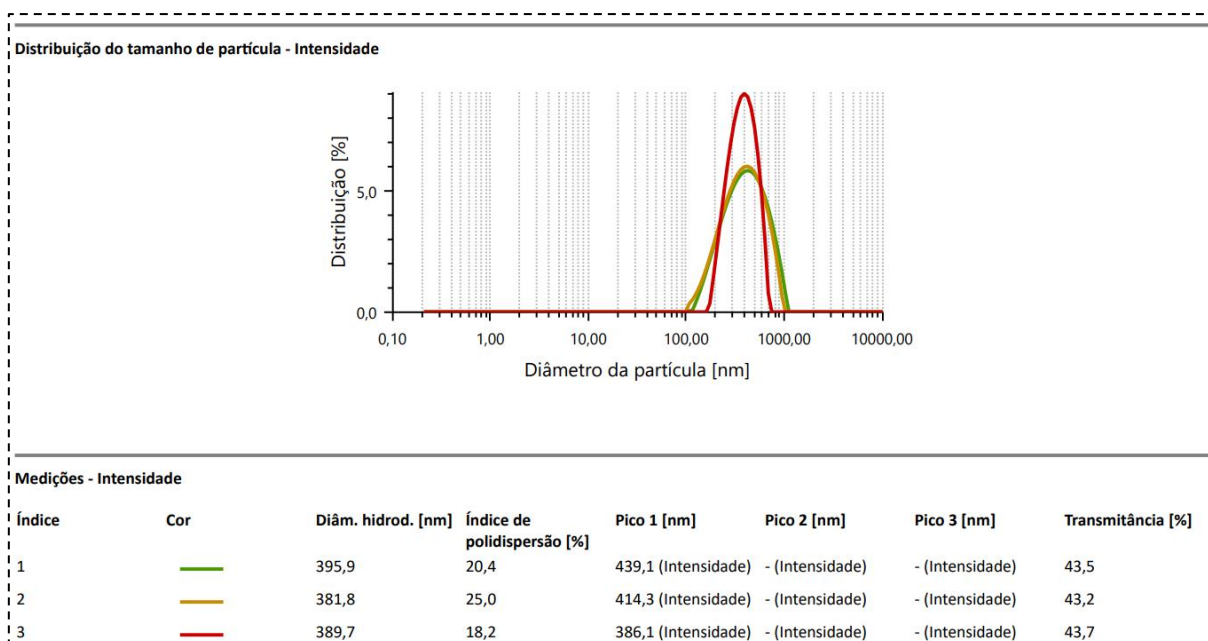


Fonte: Próprio autor.

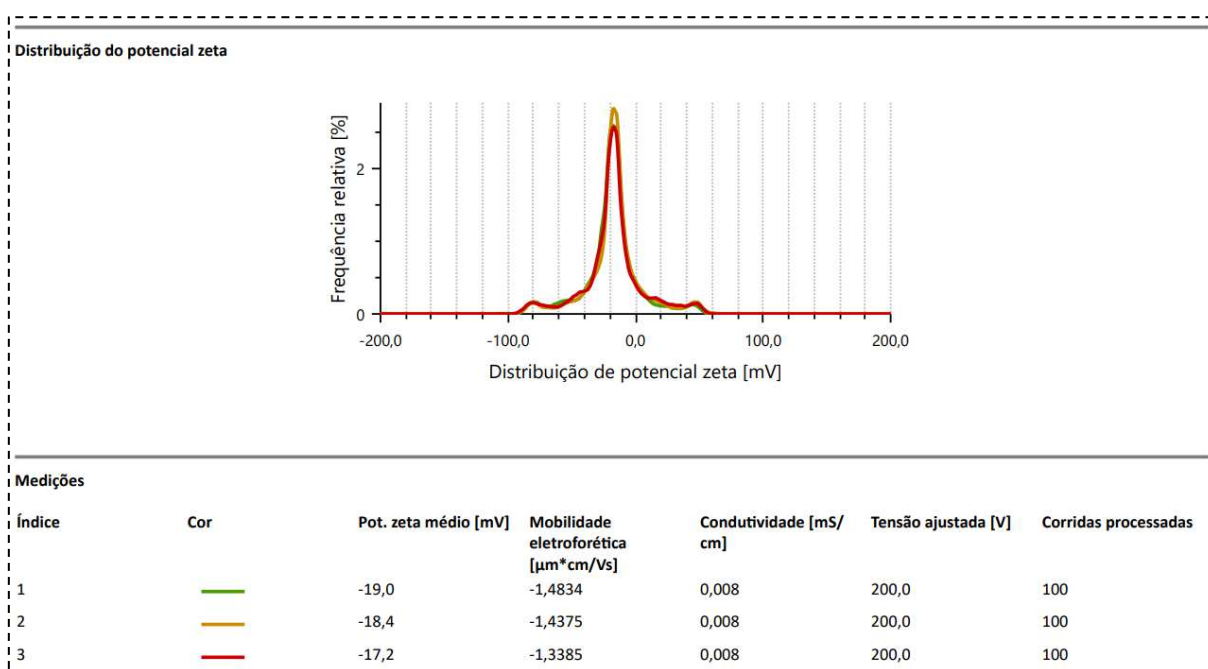
Figura 2. Potencial zeta do lipossoma do composto 4.



Fonte: Próprio autor.

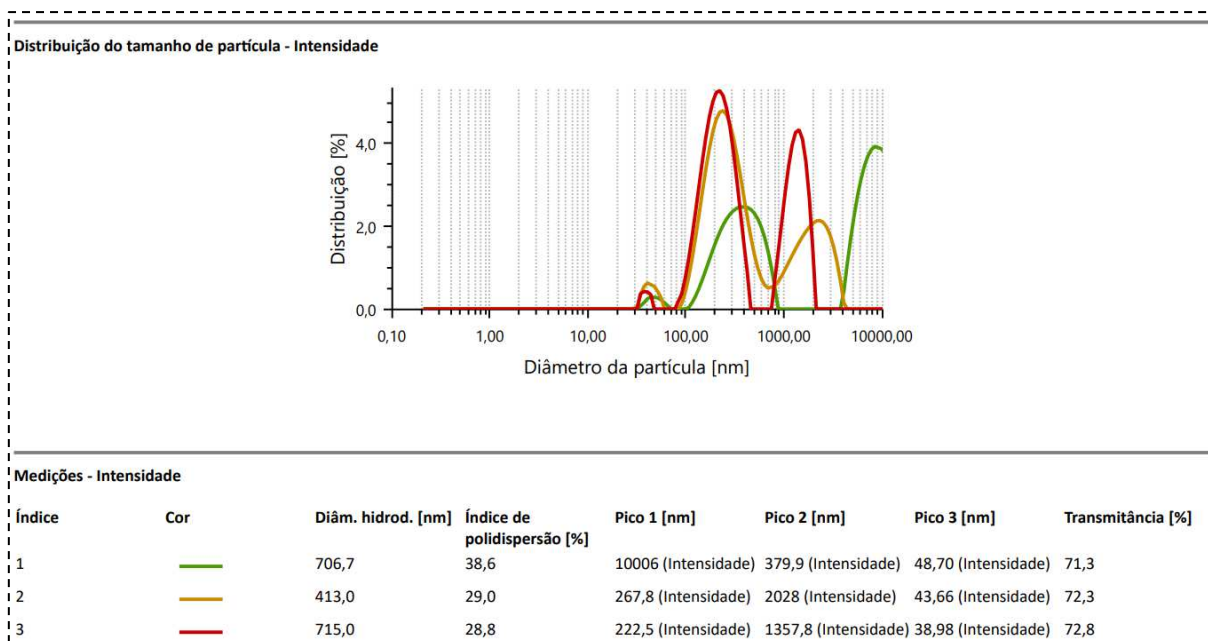
Figura 3. Tamanho e índice de polidispersão do lipossoma do composto **6**.

Fonte: Próprio autor.

Figura 4. Potencial zeta do lipossoma do composto **6**.

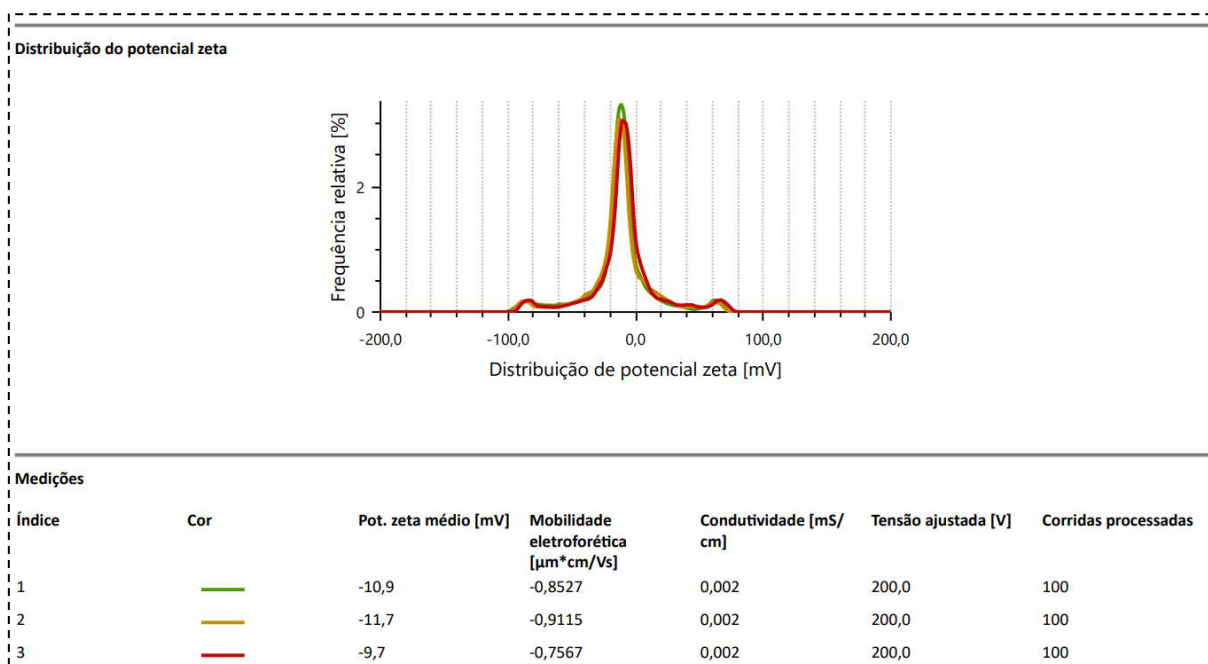
Fonte: Próprio autor.

Figura 5. Tamanho e índice de polidispersão do lipossoma do composto **79**.



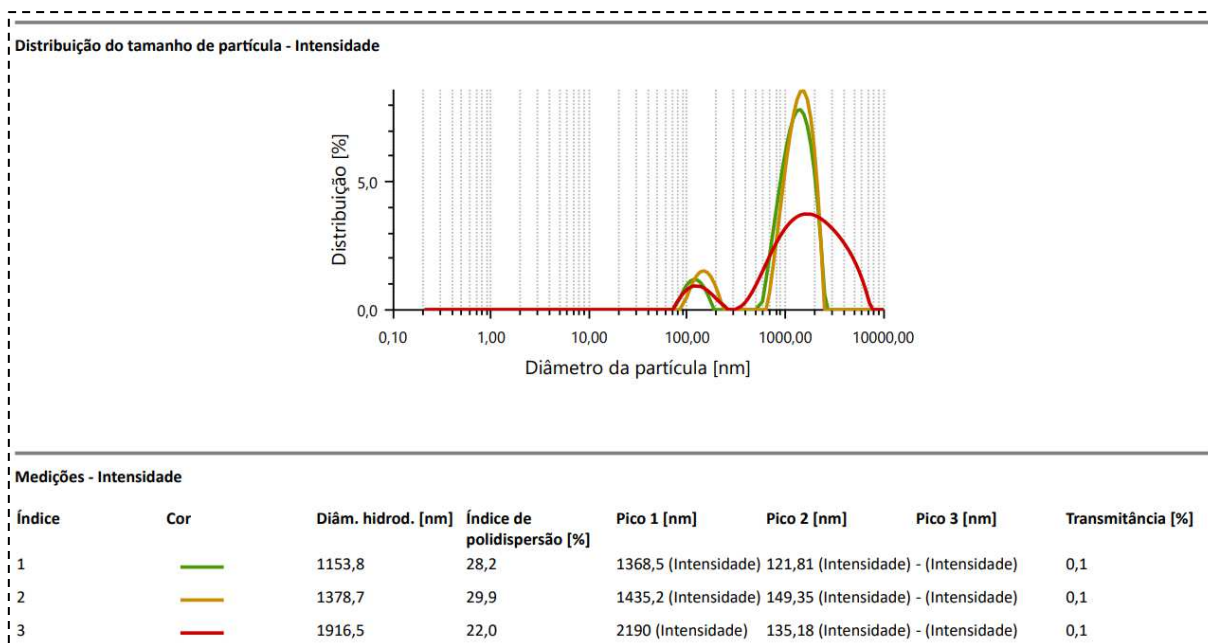
Fonte: Próprio autor.

Figura 6. Potencial zeta do lipossoma do composto **79**.



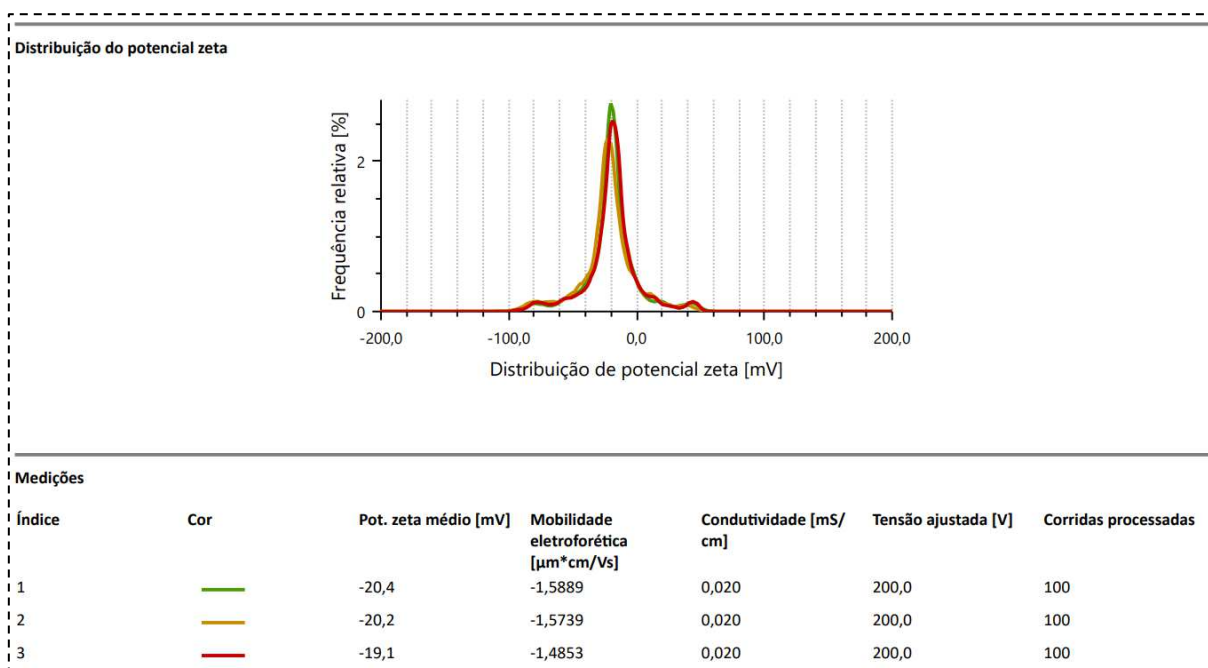
Fonte: Próprio autor.

Figura 7. Tamanho e índice de polidispersão do lipossoma do composto **80**.



Fonte: Próprio autor.

Figura 8. Potencial zeta do lipossoma do composto **80**.



Fonte: Próprio autor.