



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ANA CAROLINA RAMOS GIMENES

**ANÁLISE *IN VITRO* E *IN SILICO* DA ATIVIDADE ANTI-
Mycobacterium tuberculosis DE DERIVADOS DE
BENZOILTIOUREIAS**

ANA CAROLINA RAMOS GIMENES

**ANÁLISE *IN VITRO* E *IN SILICO* DA ATIVIDADE ANTI-
Mycobacterium tuberculosis DE DERIVADOS DE
BENZOILTIOUREIAS**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcelle de Lima Ferreira Bispo.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Cristina Perez.

Londrina
2026

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

G491 Gimenes, Ana Carolina Ramos .
Análise In Vitro E In Silico Da Atividade Anti-Mycobacterium tuberculosis De Derivados De Benzoiltiureias / Ana Carolina Ramos Gimenes. - Londrina, 2026.
76 f. : il.

Orientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo.
Coorientador: Carla Cristina Perez.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2026.
Inclui bibliografia.

1. Tuberculose - Tese. 2. Tioureias - Tese. 3. Docking Molecular - Tese. 4. Lipossomas - Tese. I. Bispo, Marcelle de Lima Ferreira. II. Perez, Carla Cristina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDU 61

ANA CAROLINA RAMOS GIMENES

**ANÁLISE *IN VITRO* E *IN SILICO* DA ATIVIDADE ANTI-
Mycobacterium tuberculosis DE DERIVADOS DE
BENZOILTIOUREIAS**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Priscila Goes Camargo
Universidade Federal do Rio de Janeiro -
UFRJ

Londrina, 20 de fevereiro de 2026.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora Dr.^a Marcelle de Lima Ferreira Bispo por todo conhecimento e pela paciência. Posso me considerar apenas sortuda por ser sua aluna desde 2020. Graças a sua mentoria a pesquisa se tornou um lugar em que pude me sentir realizada. Além disso, gostaria de agradecer todo o grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais que não hesitou em me acolher em uma área que eu não era familiarizada. Ainda, me permitiu conhecer pessoas incríveis e a aprender que o ambiente da pesquisa pode sim ser saudável. Levarei todos para sempre em minhas memórias, em especial aos meus amigos Ana Heloísa e Fabrício que fizeram todas as confraternizações inesquecíveis.

Também gostaria de agradecer aos meus amigos, Isaura, Isadora e Miho, que me acompanharam nessa jornada e me deram força para continuar. Sem vocês eu não chegaria aqui.

Aos meus pais, Miriam e Marcelo, eu gostaria de agradecer por todo apoio e incentivo a sempre continuar estudando, além do constante suporte financeiro. Ainda gostaria de agradecer a minha irmã Taciani, que mesmo indiretamente contribuiu para toda minha carreira acadêmica, além de estar sempre presente para alegrar meus dias.

Sou imensamente grata todos os técnicos do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário, principalmente a Danna e a professora Dr.^a Eliana Carolina Vespero, que me ajudaram em incontáveis dificuldades.

Gostaria de agradecer também ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da UEL e ao Laboratório Multiusuário UTFPR - Campus Londrina por toda ajuda.

Por fim, agradeço a Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento.

RESUMO

GIMENES, Ana Carolina Ramos. **Análise *In Vitro* e *In Silico* da Atividade Anti-*Mycobacterium tuberculosis* De Derivados De Benzoiltioureias**. 2026. **76**. Defesa de Mestrado – Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que afeta mais de 10 milhões de pessoas. Atualmente, uma preocupação mundial é o aumento do número de casos de resistência aos fármacos, o que ressalta ainda mais a necessidade de novas alternativas terapêuticas para a TB, com menor tempo de uso e menor toxicidade. A parede celular desse bacilo dificulta o desenvolvimento de novos antimicrobianos, porém, permite a utilização de alvos específicos, essenciais à sua manutenção, como as desidratases AB (HadAB). Sua inibição afeta a sobrevivência dos bacilos, como já demonstrado pelo fármaco isoxil, derivado de tioureias, que exerce esse efeito. Aliada a isso, metodologias mediadas por computador, como o *docking* molecular, permitem prever o encaixe da molécula de interesse no alvo desejado, aumentando as chances de sucesso na busca de novas moléculas inibidoras. No contexto da TB, sistemas de liberação de fármacos, como os lipossomas, permitem a entrega direcionada ao alvo, além de melhorarem a solubilidade das substâncias. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade anti-Mtb de derivados de benzoiltioureias livres e encapsulados (**RTB05**, **RTB32**, **RTB286** e **RTB287**). E, posteriormente, realizar estudos *in silico* mais específicos para identificar novos possíveis hits, para que sua atividade seja avaliada *in vitro*. Para isso, as substâncias foram encapsuladas em lipossomas catiônicos, obtendo-se tamanhos médios (277,98 a 477,03 nm) em homogeneidade (20,60 a 26,86%) e não agregados (42,30 a 46,15 mV). A partir disso, a concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias livres e encapsuladas foi determinada frente à cepa sensível H₃₇R_v de Mtb, resultando em valores inibitórios acima de 1,0 mM. Com base nisso, estudos *in silico* foram conduzidos com as melhores tiouréias não oxidadas, da quimioteca do Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais, como forma de reavaliar sua abordagem como pró-fármacos, assim como o isoxil. Isso resultou em três moléculas (**RTB288**, **RTB299** e **RML35**) que interagiam com pelo menos um resíduo de aminoácido do sítio catalítico da enzima HadAB (His41 e Asp36) e com uma das águas de reconhecimento molecular (HOH330, HOH339, HOH353 e HOH434). Elas ainda se adequaram a todas as regras de fármaco-similaridade, apresentando alta absorção intestinal e inibição da glicoproteína-P em estudos *in silico*. Todas as moléculas foram encapsuladas resultam em vesículas estáveis (22,06 a 27,56 mV), de tamanhos variados (428,50 a 983,53 nm) e com homogeneidade apenas nas **RTB288** e **RTB299** (37,10 e 23,50%). Posteriormente, um novo CIM foi determinado com as três moléculas livres **RTB288** e **RTB299** apresentaram valores de CIM menores $7,81 \times 10^{-3}$ mM, e **RML35** apresentou inibição > 1,0 mM. Tais resultados abriram novas perspectivas para estudos futuros com as substâncias encapsuladas em cepas resistentes, além de estudos de citotoxicidade frente a células de mamíferos, para determinar se os lipossomas conseguem reduzir o efeito citotóxico das substâncias.

Palavras-chave: tuberculose; HadAB; docking molecular; tioureias; lipossomas.

ABSTRACT

GIMENES, Ana Carolina Ramos. *In Vitro and In Silico Analysis of the Anti-Mycobacterium tuberculosis Activity of Benzoylthiourea Derivatives*. 2026. **76**. Defesa de Mestrado – Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that affects more than 10 million people. Currently, a global concern is the increasing number of cases of resistance to conventional drugs, which further highlights the need for new therapeutic alternatives for TB, with shorter treatment times and lower toxicity. The cell wall of this bacillus hinders the development of new antimicrobials but allows the use of specific targets essential for its maintenance, such as dehydratases AB (HadAB). Its inhibition prevents the survival of the bacilli, as already demonstrated by the drug isoxyl, a thiourea derivative, which exerts this mechanism of action. In addition, computer-mediated methodologies, such as molecular docking, allow predicting the fit of the molecule of interest to the desired target, increasing the chances of success. In the context of TB, drug delivery systems, such as liposomes, allow targeted delivery to the target, in addition to improving the solubility of substances. Thus, the objective of this work was to perform the in vitro evaluation of the anti-Mtb activity of free and encapsulated benzoylthiourea derivatives (**RTB05**, **RTB32**, **RTB286** and **RTB287**). Subsequently, more specific in silico studies were conducted to identify new potential hits, so that their activity could be evaluated in vitro. For this purpose, the substances were encapsulated in cationic liposomes, obtaining average sizes (277,98 to 477,03 nm) in homogeneity (20,60 to 26,86%) and non-aggregated (42,30 to 46,15 mV). From this, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the free and encapsulated substances was determined against the sensitive H₃₇R_v strain of Mtb, resulting in inhibitory values above 1,0 mM. Based on this, in silico studies were conducted with the best non-oxidized thioureas from the chemical library of the Laboratory for the Synthesis of Medicinal Molecules, in order to reassess their potential as prodrugs, similar to isoxyl. This resulted in three molecules (**RTB288**, **RTB299**, and **RML35**) that interacted with at least one amino acid residue of the catalytic site of the HadAB enzyme (His41 and Asp36) and with one of the molecular recognition waters (HOH330, HOH339, HOH353, and HOH434). They also met all the rules of drug-similarity, showing high intestinal absorption and inhibition of P-glycoprotein in in silico studies. All molecules were encapsulated, resulting in stable vesicles (22,06 to 27,56 mV) of varying sizes (428,50 to 983,53 nm), with homogeneity only in **RTB288** and **RTB299** (37,10 and 23,50%). Subsequently, a new MIC was determined with the three free molecules. **RTB288** and **RTB299** showed lower MIC values of $7,81 \times 10^{-3}$ mM, while **RML35** showed inhibition $> 1,0$ mM. These results opened new perspectives for future studies with resistant strains, including those of the encapsulated substances, as well as cytotoxicity studies against mammalian cells, to determine if liposomes can reduce the cytotoxic effect of the substances.

Keywords: tuberculosis; HadAB; molecular docking; thioureas; liposomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de mortes por TB entre 2010 – 2023, estimando o efeito da pandemia COVID-19 sobre o número de óbitos entre 2020 – 2023.....	14
Figura 2 – Coeficiente de mortalidade e número de óbitos por TB no Brasil (2013 - 2023).....	15
Figura 3 – Mecanismo fisiopatológico de disseminação de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> no hospedeiro.....	16
Figura 4 – Estrutura química dos compostos INH, RIF, EMB, PZA utilizados como primeira linha de tratamento da TB	19
Figura 5 – Fármacos utilizados para o tratamento da TB e seus respectivos alvos moleculares de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Figura 6 – Classificação dos fármacos recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil para o tratamento da TB resistente	21
Figura 7 – Composição da parede celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
Figura 8 – Vias de biossíntese dos ácidos micólicos a partir de ácidos graxos em Mtb	25
Figura 9 – Estrutura cristalográfica dos heterodímeros HadAB e HadBC de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
Figura 10 – Exemplos de moléculas com potente atividade antimicrobiana descobertas por meio de metodologias computacionais	28
Figura 11 – Estruturas de moléculas (destaque em verde para o grupamento tioureia) com atividade inibitória frente à enzima HadAB de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
Figura 12 – Mecanismo de ação do composto TAC e de seu derivado NSC19723.....	32
Figura 13 – REA empregado para construção das 53 benzoiltioureias da quimioteca do LaSMMed.....	33
Figura 14 – Estruturas das tioureias RTB05 , RTB32 , RTB286 e RTB287 selecionadas pela triagem virtual realizada por De Melo Milani (2024). Nos retângulos abaixo das estruturas estão representados os seus respectivos ácidos sulfênicos bem como os estereoisômeros gerados a partir da oxidação da porção tiouréia	34
Figura 15 – Esquema demonstrando os diferentes tipos de sistemas de	

liberação lipossomais	36
Figura 16 – Metodologia de produção de lipossomas por hidratação do filme lipídico	38
Figura 17 – Curvas de calibração de RTB05, RTB32, RTB286 e RTB287	48
Figura 18 – Estrutura do ligante co-cristalizado FSE e o ligante simulado pelo GOLD sobrepostas.....	51
Figura 19 – Interações intermoleculares das RTB288 e RTB299 e RML35 no sítio catalítico da MtbHadAB	53
Figura 20 – Interações intramoleculares do ligante co-cristalizado FSE com a MtbHadAB.....	55
Figura 21 – Espectro de varredura UV-Vis das moléculas RTB288, RTB299 e RML35 entre os comprimentos de onda de 250 a 500 nm.....	58
Figura 22 – Curvas de calibração dos RTB288, RTB299, RML35 para o posterior doseamento e EE.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades estruturais e elétricas dos lipossomas preparados	46
Tabela 2 – Concentração teorizada e a corrigida dos lipossomas com base na eficiência de encapsulamento	49
Tabela 3 – CIM das moléculas livres e encapsuladas frente a Mtb H ₃₇ R _v	49
Tabela 4 – Comparação entre o ranking de <i>fitness score</i> obtido por docking molecular pelo presente trabalho e no de De Melo Milani (2024)	52
Tabela 5 – Propriedades de Fármaco-similaridade, Absorção, Distribuição e Inibição da RTB288 , RTB299 e RML35	56
Tabela 6 – Propriedades estruturais e elétricas dos novos lipossomas preparados	58
Tabela 7 – Concentração teorizada e a corrigida dos novos lipossomas com base na eficiência de encapsulamento	60
Tabela 8 – CIM da RTB288 , RTB299 e RML35 frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H ₃₇ R _v).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Alanina Desidrogenase
AGs	Ácidos Graxos
AIDD	<i>Artificial Intelligence Drug Discovery</i> (Desenvolvimento De Fármacos Auxiliado Por Inteligência Artificial)
AMs	Ácidos Micólicos
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BHE	Barreira Hematoencefálica
CADD	<i>Computer Aided Discovery</i> (Descoberta De Fármacos Auxiliadas Por Computadores)
CC ₅₀	Concentração Citotóxica de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Col	Colesterol
DAT	Diaciltralose
DDS	<i>Drug Delivery System</i> (Sistema de Liberação de Fármacos)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico de Luz)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano
EE	Eficiência de Encapsulamento
EMB	Etambutol
EmbAB	Genes das Enzimas Arabinosiltransferases
EthA	Flavina Monoxigenase
FAS-I	Ácido Graxo Sintase I
FAS-II	Ácido Graxo Sintase II
FS	<i>Fitness Score</i>
FSE	Fisetina
GOLD	<i>Genetic Optimization for Ligand Docking</i> (Otimização Genética Para

	Acoplamento De Ligantes)
gp-P	Glicoproteína P
Hads	β -hidroxiacil-ACP desidratases
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
InhA	Trans-2-enoil-ACP redutase A
IS	Índice de Seletividade
ISO	Isoxil
Kas	β -cetoacil-ACP sintetases
LAM	Lipoarabinomanano
LaSMMed	Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais
LBDD	<i>Ligand Based Drug Design</i> (Desenvolvimento De Fármacos Baseado No Ligante)
MabA	β -cetoacil-ACP redutase
MDR-TB	Tuberculose Multirresistente
MLVs	<i>Multilamellar Vesicles</i> (Vesículas Multilamelares)
MM	Massa Molecular
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólico
nº.ALH	Número de Aceptores de Ligação de Hidrogênio
nº.DLH	Número de Doadores de Ligação de Hidrogênio
nº.Rot	Número de Ligações Rotacionáveis
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAT	Poliaciltrealose
PBP	Proteína de Ligação à Penicilina
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de Dados de Proteínas)

PDIM	FtioceroI Dimicocerosato
PEG	Polietilenoglicol
PIM	Fosfatidilinositol Manosídeo
PZA	Pirazinamida
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i> (Relação Estrutura-Atividade Quantitativa)
REA	Relação Estrutura Atividade
RIF	Rifampicina
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (Desvio Médio Quadrático)
RR-TB	Tuberculose Rifampicina Resistente
SBDD	<i>Structure Based Drug Design</i> (Desenvolvimento De Fármacos Baseado Na Estrutura)
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
SPC	Fosfatidilcolina de Soja
TAC	Tiacetazona
TB	Tuberculose
TDM	Dimicolato de Trealose
ThyA	Timidilato Sintase
TMM	Monomicolato de Trealose
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i> (Área De Superfície Polar Topológica)
TSA	Teste de Sensibilidade Antimicrobiano
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Fator</i> (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
XDR-TB	Tuberculose Extensivamente Resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	TUBERCULOSE	14
1.2	<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	22
1.3	METODOLOGIAS DE DESCOBERTA DE FÁRMACOS AUXILIADAS POR COMPUTADORES	27
1.4	ENZIMA HAD DE MTB COMO POTENCIAL ALVO MOLECULAR	30
1.5	SISTEMA DE ENTREGA DE FÁRMACOS – LIPOSSOMAS	34
2	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
2.1.1	Determinar <i>In Vitro</i> o Efeito Inibitório em <i>M.tuberculosis</i> De Benzoiltioureias Seleccionadas Por Meio De Triagem Virtual Previamente Realizada	40
2.1.2	Realizar Estudos <i>In Silico</i> Para Identificar Novos Compostos Com Atividade Inibitória Da Enzima HadAB E Analisar Suas Interações Alvo-Ligante E Os Parâmetros De Fármaco-Similaridade	40
3	METODOLOGIA	41
3.1	ENCAPSULAMENTO EM LIPOSSOMAS	41
3.1.1	Preparo das Soluções Estoque	41
3.1.2	Hidratação de Filme Lipídico	41
3.1.3	Caracterização dos Lipossomas	41
3.1.4	Doseamento das Moléculas	42
3.1.4.1	Espectro de varredura	42
3.1.4.2	Construção das curvas de calibração	42
3.1.4.3	Eficiência de encapsulamento (EE)	42
3.2	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	43
3.3	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	43
3.3.1	Preparação do Alvo Molecular HadAB	44
3.3.2	Preparação dos Ligantes	44
3.3.3	<i>Docking</i> Molecular	44
3.3.4	Análise das Propriedades de Fármaco Similaridade	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	ENCAPSULAMENTO DAS RTB 05, RTB32, RTB286 E RTB287 EM LIPOSSOMAS	

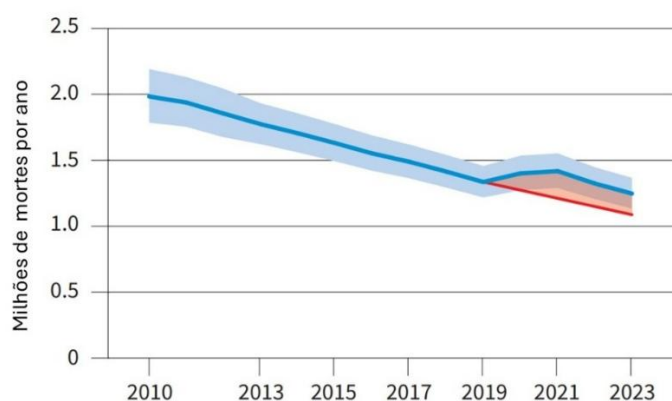
	46	
4.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS RTB 05, RTB32, RTB286 E RTB287 EM MTB.....	49
4.3	DOCKING MOLECULAR DAS TIOUREIAS NÃO OXIDADAS.....	51
4.4	ENCAPSULAMENTO DAS RTB288, RTB299 E RML35 EM LIPOSSOMAS	57
4.5	ATIVIDADE BIOLÓGICA DA RTB 288, RTB 299 E RML 35	60
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Os primeiros relatos históricos da infecção datam a civilizações do período Neolítico, entretanto, a TB atualmente ainda se consolida como um problema de saúde pública (Hershkovitz et al., 2015). Atualmente, Mtb infecta 10,7 milhões de pessoas no mundo, das quais causa a morte de 1,23 milhão por ano, sendo 2024 o primeiro ano a apresentar uma queda no número de casos desde 2020. Entretanto, só em 2024, a Organização Mundial de Saúde (OMS) registrou 8,3 milhões de novos casos de TB, sendo, pelo segundo ano consecutivo, o maior valor de incidência já reportado desde a fundação da organização. Assim, em 2023, após um hiato de três anos devido à pandemia da COVID-19, a TB volta a ocupar o topo da lista de maior causa de morte por um único agente infeccioso no mundo. O período pandêmico consolidou-se como um grande retrocesso nos marcos epidemiológicos da TB, pois limitou o acesso da população às unidades básicas de saúde e aos hospitais, o que resultou na diminuição do número de pacientes com TB diagnosticados e em tratamento. Estima-se que durante esse período (2020 – 2023) houve uma lacuna de 2,7 milhões de casos que não foram reportados em relatórios oficiais e um excedente de mais de 700.000 mortes por TB nesse período (Figura 1) (WHO, 2024, 2025).

Figura 1 - Número de mortes por TB entre 2010 – 2023, estimando o efeito da pandemia COVID-19 sobre o número de óbitos entre 2020 – 2023



— A linha azul representa o número de mortes pela TB. — A área sombreada em azul representa o intervalo de confiança de 95% do número real estimado de mortes causadas pela TB. — A linha vermelha mostra o número estimado de mortes que teriam ocorrido por causa da TB na ausência da pandemia de COVID-19. — A área sombreada em vermelho mostra o excesso de mortes por TB decorrente das interrupções associadas à pandemia de COVID-19.

Fonte – Adaptado de (WHO, 2024)

Em decorrência disso, vários marcos definidos para 2025 pela “Estratégia de Eliminação da Tuberculose” (do inglês *End TB Strategy*) tiveram que ser adiados, pois, p. ex., a meta de reduzir em 50% a incidência de TB no período de 2015 a 2024 só atingiu 12%. Como agravante, a região das Américas registrou um aumento das taxas de incidência pelo quarto ano consecutivo. Dentre os países componentes dessa região, apenas o Brasil encontra-se citado em duas listas de alto índice de casos da OMS: de TB e de TB com coinfeção de HIV (WHO, 2025).

Assim, o Brasil registra um total de 84.308 novos casos anuais, o que representa um aumento de 21% em comparação ao quadriênio de 2020 – 2024 e uma alta de mais de 80% nas taxas de incidência entre 2023 e 2024. O que foi amplificado pelo número de mortes, ultrapassando um limiar de 6 mil, que só foi observado antes há 26 anos (Figura 2). Fatores como a desnutrição e a desigualdade socioeconômica são alguns dos principais fatores que influenciam essa disparidade em comparação com outras regiões da OMS. Assim, populações vulneráveis, como as populações pretas e pardas, representam 65,8% dos casos de TB no Brasil (Brasil, 2025; WHO, 2025) .

Figura 2 - Coeficiente de mortalidade e número de óbitos por TB no Brasil (2013 - 2023)

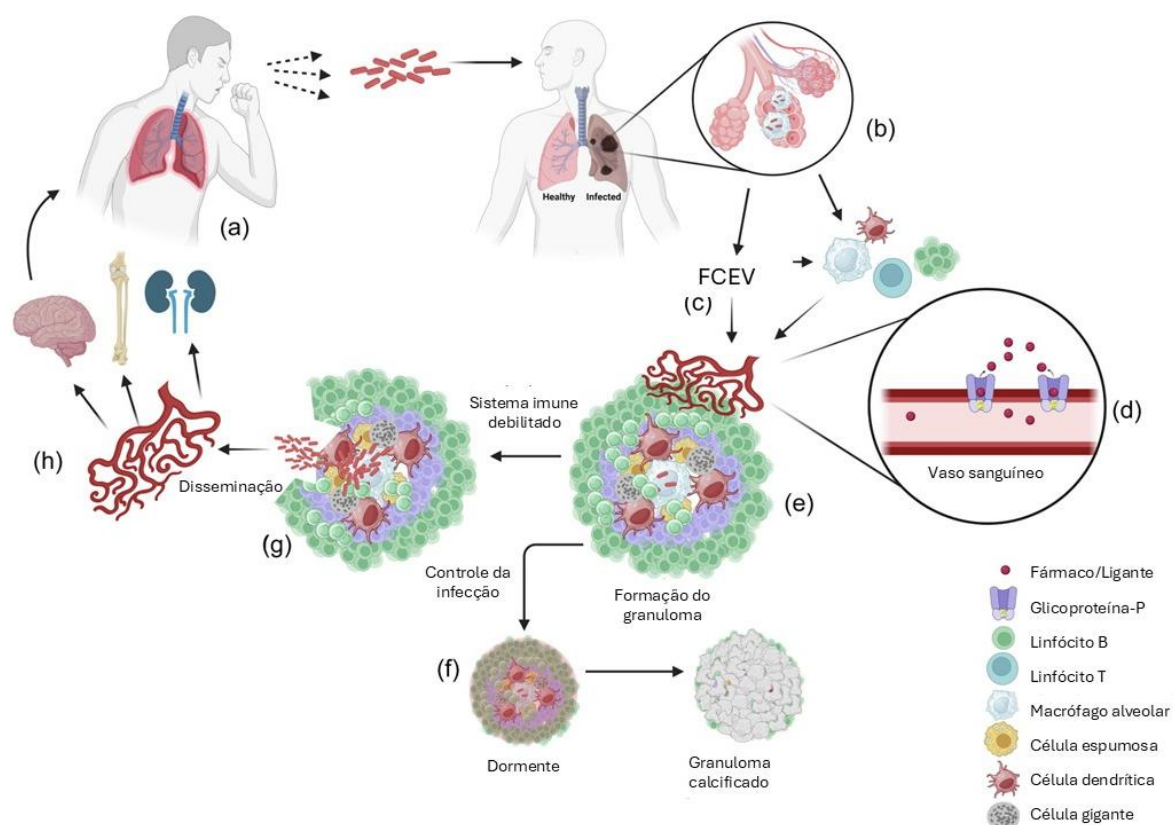


Fonte – (Brasil, 2025) .

A transmissão da TB ocorre por meio de aerossóis contendo o bacilo,

denominados partículas de Flügge, expelidos quando um indivíduo infectado fala, tosse ou espirra. Uma vez suspensas e expostas ao ambiente, essas gotículas ressecam (núcleos de Wells) e podem ser inaladas por outro indivíduo. Estima-se que três bacilos sejam suficientes para desencadear a TB; por isso, um paciente com a infecção ativa consegue infectar, anualmente, até 15 pessoas de seu convívio. (Figura 3) (Barreto et al., 2014; Donald et al., 2018; WHO, 2025). Dessa forma, habitações mal ventiladas e úmidas, como as favelas, facilitam a disseminação da doença para os demais membros da família (Barreto et al., 2014).

Figura 3 – Mecanismo fisiopatológico de disseminação de *Mycobacterium tuberculosis* no hospedeiro



(a) A tuberculose se dissemina de um indivíduo infectado a outro saudável por meio de gotículas no ar. (b) *Mtb* atinge os pulmões pela traqueia e infecta os macrófagos alveolares. (c) Esses macrófagos infectados iniciam uma cascata de eventos que, eventualmente, recrutam células imunes e desencadeiam a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). (d) O VEGF desencadeia a formação de novos vasos sanguíneos, levando, eventualmente, a um excesso de bombas de efluxo do tipo ABC, geralmente a glicoproteína de permeação (gp-P), resultando em concentrações mais baixas de medicamentos durante o tratamento da tuberculose. (e) Os novos vasos sanguíneos também permitem às células do sistema imune chegar ao local da infecção, onde a controlam por meio da formação de granulomas. (f) A contenção bem-sucedida da infecção leva à fase latente e,

eventualmente, à calcificação. ^(g) A falha na contenção da infecção, devido a doenças predisponentes ou a um sistema imunológico comprometido, leva à ruptura do granuloma e à liberação de Mtb. ^(h) A disseminação de Mtb leva à propagação da infecção para órgãos próximos, por meio dos vasos sanguíneos, com efeitos negativos na saúde do hospedeiro.

Fonte – Adaptado de (Parida et al., 2024)

Em um novo hospedeiro, a mucosa do trato respiratório superior é a primeira linha de defesa contra Mtb, podendo envolvê-lo no muco e eliminá-lo por meio da deglutição. As bactérias que alcançam os alvéolos serão internalizadas por células fagocíticas, como os macrófagos alveolares, que então migram para o interstício para promover a destruição do bacilo. Concomitantemente, nos alvéolos, os bacilos que evadem da fagocitose podem apresentar uma formação em cordas (*Cord Formation*) capazes de se inserir nas junções célula-célula do epitélio, permitindo a disseminação do patógeno para o interstício (Viljoen; Dufrêne, 2023).

No interstício, os bacilos podem ser efetivamente eliminados pelos macrófagos ou replicar-se neles. Pode ocorrer a disseminação de bacilos a partir do pulmão para linfonodos adjacentes, permitindo a formação de uma resposta imune adaptativa e a disseminação hematogênica dos bacilos para focos extrapulmonares (Alsayed; Gunosewoyo, 2023; Leung, 1999).

Como estratégia de sobrevivência, os bacilos utilizam a formação em corda para comprimir o nucléolo da célula fagocítica, diminuindo a eficácia da resposta imune (Viljoen; Dufrêne, 2023). Ademais, também são capazes de induzir a formação de macrófagos espumosos, caracterizados pelo acúmulo de lipídios, os quais apresentam uma resposta imune atenuada e atuam como fonte de ácido graxos (Singh et al., 2012). Isso facilita a replicação intracelular e a liberação de bacilos no espaço extracelular. Outros mecanismos de evasão envolvem a inibição da maturação do fagossomo e o bloqueio da sua fusão com o lisossomo e sua consequente acidificação, além da neutralização de metais pesados e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Kanabalan et al., 2021; Liu; Liu; Ge, 2017).

Assim, estabelece-se um ciclo de liberação de bacilos pelos macrófagos incapacitados e o recrutamento de novas células fagocíticas para a contenção ou eliminação da infecção, denominada TB primária. Todo esse processo exacerba a resposta inflamatória, levando ao aumento de citocinas sinalizadoras que fazem o aporte de células imunes, as quais virão a compor o granuloma, marco histopatológico

da TB pulmonar (Flynn; Chan, 2022). Os granulomas constituem-se de um aglomerado de células imunes, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, fibroblastos e linfócitos B e T.

Em indivíduos imunocompetentes, os granulomas servem para “esterilizar” ou conter a infecção, tornando-se calcificados ou escleróticos (Chandra; Grigsby; Philips, 2022; Kanabalan et al., 2021). Portanto, em 90% dos indivíduos, a infecção primária permanece em latência (assintomática e não transmissível) por diversos anos até a reativação. Durante esses anos, *Mtb* permanece intracelular, em estado de quiescência, reduzindo seu metabolismo para garantir sua sobrevivência (Lin; Desmond, 2014). Dessa forma, nos dois primeiros anos, o risco de perpetuação da infecção no hospedeiro é maior, chegando a 5% (Barreto et al., 2014; WHO, 2025).

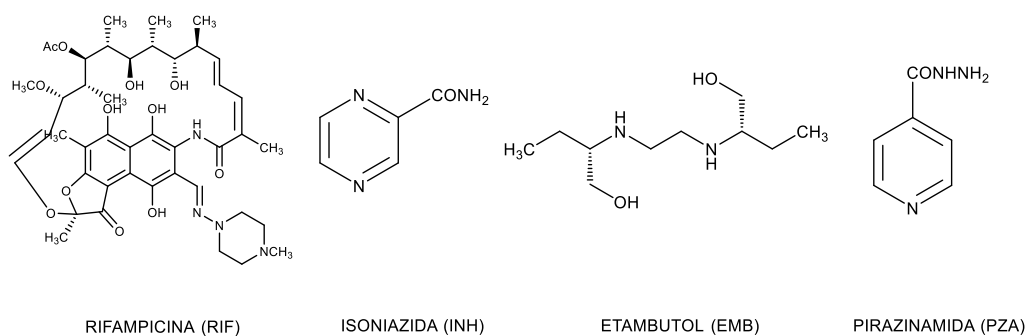
Entretanto, episódios de imunodepressão podem levar à reativação da infecção, caracterizada como infecção secundária. Fatores como coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), desnutrição, uso de imunossupressores, quimioterapia, alcoolismo, tabagismo, dependência química, diabetes descontrolada, câncer, sepse e falência renal crônica são facilitadores da reativação da TB (Luies; Preez, 2020). Nesse caso, há progressão e maturação do granuloma, com maior presença de macrófagos espumosos e acúmulo de resíduos celulares no centro, abrigando um nicho de bacilos e evoluindo para um centro necrótico, marco dos granulomas caseosos (Chai; Zhang; Liu, 2018). E, quando esses colabam, formam cavidades que permitem a liberação de bacilos no meio extracelular, caracterizando a TB ativa. A partir disso, os bacilos ganham acesso às vias aéreas e são aerossolizados, disseminando-se para novos hospedeiros e iniciando um novo ciclo (Russell et al., 2009).

No início da infecção os sintomas são inespecíficos, como tosse seca ou produtiva, sudorese noturna, febre e perda de peso, e em alguns casos é possível observar dor no peito e falta de ar, porém, em adultos, até 5% deles podem permanecer assintomáticos (Korzeniewska-Kosela et al., 1994). A maioria dos casos de TB ativa, perto de 80%, manifesta-se na forma pulmonar, mas, também pode afetar sítios extrapulmonares, como os sistemas linfático, gastrointestinal, nervoso central, reprodutivo, musculoesquelético e articular, além da pele e do fígado. E em casos graves, as lesões são disseminadas em múltiplos órgãos, denominadas TB miliar (Brasil, 2019, 2025; Lin; Desmond, 2014).

A primeira linha de tratamento atual para TB suscetível consiste

majoritariamente em fármacos descobertos entre 1950 e 1970, sendo eles: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA) (Figura 4) (Brasil, 2019; Chauhan et al., 2021). Esses, em adolescentes e adultos, são administrados em esquemas extensos de seis meses, sendo os dois primeiros meses um coquetel dos quatro fármacos seguido de quatro meses de RIF e INH. Enquanto, para crianças, o esquema permanece o mesmo, com a exclusão do etambutol nos dois primeiros meses. Dessa forma, esse esquema terapêutico compreende duas fases de ação: inicialmente, os dois primeiros meses correspondem à fase de ataque, que visa reduzir e eliminar os bacilos rapidamente, seguida da fase de manutenção, destinada à eliminação dos bacilos remanescentes e à prevenção do ressurgimento (Brasil, 2019). Nos casos em que o esquema de tratamento é concluído, a chance de cura atinge 90%, enquanto, em pacientes não tratados, a TB apresenta uma mortalidade próxima de 50% (WHO, 2025) .

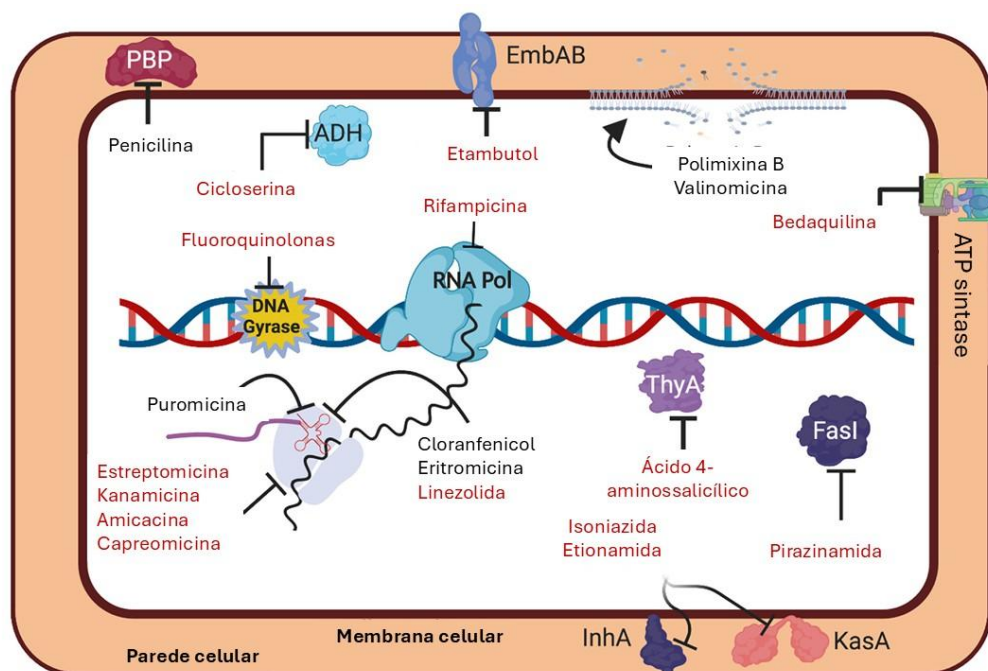
Figura 4 - Estrutura química dos compostos INH, RIF, EMB, PZA utilizados como primeira linha de tratamento da TB



Fonte – Autora, 2026.

Os mecanismos de ação de cada fármaco diferem entre si, porém, em sua maioria, atuam sobre enzimas ou bloqueiam a síntese de moléculas essenciais para a sobrevivência de *Mtb* (Figura 5). Portanto, atuam apenas em bacilos que estão metabolicamente ativos, como na TB ativa, e não naqueles em estado de quiescência, para os quais é esperada a eliminação pelo sistema imunológico (Brasil, 2019) .

Figura 5 – Fármacos utilizados para o tratamento da TB e seus respectivos alvos moleculares de *Mycobacterium tuberculosis*



A figura apresenta os alvos moleculares dos fármacos antimicrobianos, com cinco principais mecanismos de ação. Ligação às proteínas de parede celular: *trans*-2-enoil-ACP redutase A (InhA), β -cetoacil-ACP sintetase A (KasA), genes que codificam as enzimas arabinosiltransferases (EmbAB), proteína de ligação à penicilina (PBP) e ATP sintetase. Ação na membrana celular, por degradação da membrana, como a polimixina e valinomicina. Ação sobre a maquinaria de replicação do DNA: DNA girasse. Impedir a tradução proteica do complexo ribossômico e da RNA polimerase. Atuação nas vias metabólicas: ácido graxo sintase I (Fas-I), timidilato sintase (ThyA) e alanina desidrogenase (ADH). Sendo que em vermelho estão os fármacos utilizados para a TB.

Fonte – Adaptado de (Chauhan et al., 2021).

Apesar dessas alternativas de tratamento, as cepas resistentes aos antimicrobianos de *Mtb* estão em ascensão. A resistência da bactéria se deve principalmente a polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e alterações cromossômicas (inserções, deleções, duplicações, inversões e conversões) no seu genoma, visto que o bacilo não consegue realizar a transferência horizontal de genes (Domenech et al., 2010; Shitikov et al., 2014; Silva-Pereira; Soler-Camargo; Guimarães, 2024). Três grandes categorias de resistência de TB, segundo a OMS, são identificadas: TB RIF-resistente (RR – TB), TB multirresistente (MDR – TB, resistente a RIF e INH) e TB extensivamente resistente (XDR – TB, resistente a RIF, INH, fluoroquinolonas e a um fármaco injetável de 2ª linha) (WHO, 2025). Para esses casos, o tratamento é modificado, passando a abranger esquemas terapêuticos mais longos e personalizados para cada perfil de resistência.

Dessa forma, a abordagem terapêutica para casos de resistência requer um

esquema individualizado para o paciente, considerando suas comorbidades, toxicidade, alergias, entre outros fatores. No geral, esse deve abranger quatro fármacos inéditos para o paciente, dos quais dois são essenciais para a atividade bactericida, e os outros dois são de acompanhamento, que fornecem uma ação protetora. Os fármacos são administrados por um período mínimo de 18 meses, durante os quais a fase de ataque varia de 6 a 8 meses e a fase de manutenção se estende até o final de um período estipulado. Segundo o Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, deve compor o grupo um fármaco do grupo A (levofloxacino, moxifloxacino e gatifloxacino), um do grupo B (amicacina, capreomicina, canamicina) e dois do grupo C (etionamida, protionamida, terizidona, cicloserina, linezolida e clofazimina), sendo os demais grupos utilizados apenas em casos especiais, quando não há fármacos novos para inserir no esquema (Figura 6). É imprescindível ressaltar que, além da maior duração, há maior potencial de efeitos adversos e pior prognóstico para o paciente (Brasil, 2019).

Figura 6 – Classificação dos fármacos recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil para o tratamento da TB resistente

GRUPOS	MEDICAMENTOS
GRUPO A Fluoroquinolonas ²	Levofloxacino Moxifloxacino Gatifloxacino (não disponível no SUS)
GRUPO B Injetáveis de segunda linha	Amicacina Capreomicina Canamicina (não disponível no Brasil) (Estreptomicina) ³
GRUPO C Outros grupos de segunda linha ²	Etionamida Protionamida (não disponível no Brasil) Terizidona Cicloserina (não disponível no Brasil) Linezolida Clofazimina
GRUPO D Fármacos adicionais	D1 Pirazinamida Etambutol Isoniazida em altas doses
	D2 Bedaquilina (não disponível no Brasil) Delamanid (não disponível no Brasil)
	D3 Ácido paraminossalicílico Imipenem-cilastatina* (disponível localmente) Meropenem* (disponível localmente) Amoxicilina + clavulanato de potássio* (disponível localmente)

¹ Essas recomendações são para regimes de longo prazo (com duração mínima de 18 meses). ² Os medicamentos dos grupos A e C estão em ordem decrescente de importância. ³ A estreptomicina é considerada um agente de primeira linha; portanto, sua resistência não classifica os pacientes como XDR-TB. A utilização da estreptomicina nos esquemas de tratamento para MDR-TB e RR-TB está condicionada aos pacientes que nunca a utilizaram e cujo teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) indica sensibilidade à estreptomicina. Na ausência de TSA, a estreptomicina não é indicada. ⁴

Carbapenêmicos e clavulanato de potássio (disponível em associação com amoxicilina) devem sempre ser usados em conjunto.

Fonte - (Brasil, 2019)

Atualmente, foram contabilizados 147.592 casos de MDR-TB e 25.140 de XDR-TB no mundo. Em razão da gravidade, em 2024, a OMS incluiu as cepas de RR-TB na Lista Prioritária de Patógenos Bacterianos (do inglês, *Bacterial Priority Pathogens List*) para o desenvolvimento de estratégias para o seu controle.

Apesar da alta chance de cura do tratamento da TB, há um alto índice de abandono devido à sua longa extensão, principalmente em populações vulneráveis, visto que, no Brasil, 40,8% das pessoas em situação de rua interromperam o tratamento em 2023. Isso acentua ainda mais a problemática, pois elas são 56 vezes mais suscetíveis a desenvolver TB do que a população em geral. Além disso, os efeitos adversos dos medicamentos também são outro fator contribuinte para a desistência do tratamento; entre eles, o desconforto gástrico, a icterícia, as dores nas articulações e as alterações cutâneas. E, em casos graves, pode levar a complicações maiores, como ocorre em 3 a 8% dos casos, que resultam em falência renal, hepatotoxicidade, convulsões, polineurite, entre outros, que tende a se desencadear principalmente em pessoas desnutridas, idosos, com doença hepática ou renal, ou pacientes com HIV (Bhise, 2017; Brasil, 2019, 2025).

Tendo isso em vista, torna-se cada vez mais urgente a busca de novas alternativas terapêuticas para a TB. Principalmente, que sejam acessíveis a toda a população, em esquemas de tratamento curtos, facilitando o acesso de pessoas em situação de rua ou privadas de liberdade. Ainda que apresente poucos efeitos tóxicos, pois o paciente com TB já se encontra fragilizado, isso lhe proporcionaria uma melhor qualidade de vida.

1.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

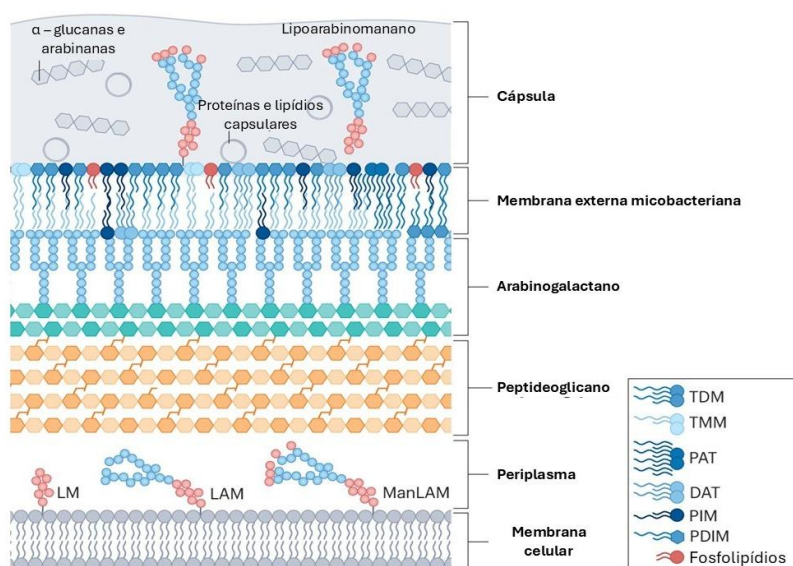
A TB pode ser causada por um grupo de micobactérias que compartilham aproximadamente 99,99% de similaridade genômica, denominado o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (do inglês *Mycobacterium tuberculosis Complex*, MTBC), composto por: *M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.bovis*, *M.caprae*, *M.microti*, *M.pinnipedii* e *M.canetti*. Entretanto, em humanos, Mtb é organismo causador de 98%

dos casos de TB (Lin; Desmond, 2014) .

O bacilo foi primeiramente descrito pelo médico alemão Robert Koch em 1882 como patógeno causador da TB (Kaufmann; Schaible, 2005). É um bacilo de crescimento lento que se destaca por sua alta capacidade metabólica como organismo prototrófico, capaz de utilizar tanto fontes de carbono quanto de nitrogênio na biossíntese de moléculas essenciais à sua perpetuação (Warner et al., 2025) . Ademais, possui uma versatilidade respiratória que, apesar de ser um microrganismo aeróbico, lhe permite sobreviver em situações de hipóxia, como as dos granulomas, ao adotar um fenótipo de quiescência (Kalia et al., 2023).

Além da versatilidade metabólica, *Mtb*, assim como outras espécies do gênero *Mycobacterium*, é classificado como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) por apresentar uma parede celular com alto conteúdo lipídico, que dificulta a entrada de corantes, como aqueles utilizados na coloração Gram (Lin; Desmond, 2014). A parede celular é composta por 60% de lipídios, que fornecem uma superfície hidrofóbica de contato entre o bacilo e o hospedeiro, o que é importante para o reconhecimento, a evasão e a modulação do sistema imune. A parede celular divide-se em uma parte externa, composta principalmente por glicolipídios, e uma parte interna, composta por ácidos micólicos (AMs). Abaixo da parede, situa-se o espaço periplasmático, que é seguido pela membrana celular, responsável pela regulação osmótica e pela passagem de solutos (Figura 7) (Singh et al., 2018).

Figura 7 – Composição da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*



TDM = dimicolato de trealose; TMM = monomicolato de trealose; PAT = poliacyltrealose; DAT =

diaciltrealose; PIM = fosfatidilinositol manosídeo; PDIM = ftiocerol dimicocerosato; LAM = lipoarabinomanano.

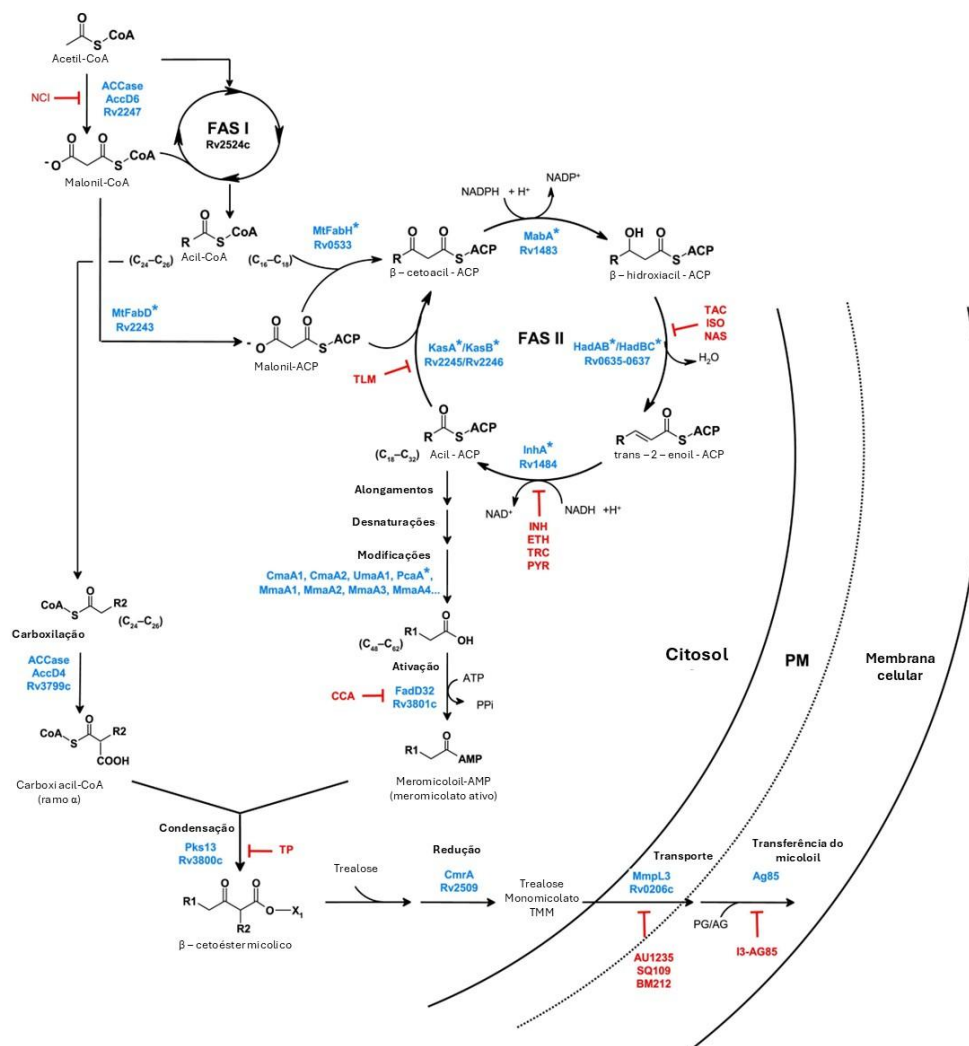
Fonte – Adaptado de (Warner et al., 2025).

O genoma circular de Mtb codifica 6% de suas proteínas, aproximadamente 200, relacionadas a produção de lipídios, sendo metade delas destinada à β -oxidação de ácidos graxos. Isso demonstra a importância dos lipídios para a sobrevivência do patógeno, visto que essa barreira lipídica também defende contra as enzimas do hospedeiro e impede a passagem de antibióticos. Isso pode ser visto experimentalmente, onde em condições anaeróbicas ocorre um espessamento da parede, prolongando a sobrevivência do bacilo (Singh et al., 2018).

Os AMs são ácidos graxos (AGs) α -ramificados β -hidroxilados de alto peso molecular (C_{70} – C_{90}) que podem variar, em complexidade e variabilidade, interespecies (Brennan; Nikaido, 1995; Daffé; Draper, 1997). Sendo já relatado na literatura que esses lipídios são majoritariamente responsáveis pela virulência de Mtb, como é o caso do fator corda (TDM) (Glickman; Cox; Jacobs, 2000). A formação desses compostos requer a síntese *de novo* por Mtb, uma vez que não é possível obtê-los diretamente do hospedeiro.

Para isso, a rota sintética inclui duas etapas, a ácido graxo sintase I (do inglês *Fatty Acid Synthase I*, FAS-I), a qual inicia a síntese de cadeias alifáticas de AG (C_{22} - C_{26}), e é constituída por uma cadeia polipeptídica com diferentes domínios e sítios catalíticos. Seguida pela ácido graxo sintase II (do inglês *Fatty Acid Synthase II*, FAS-II), constituída por quatro pares de enzimas que realizam o alongamento das cadeias até atingirem C_{48} - C_{62} , sendo elas, as β -cetoacil-ACP redutases (MabA), as β -hidroxiacil-ACP desidratases (Hads) AB e BC, a *trans*-2-enoil-ACP redutase A (InhA) e as β -cetoacil-ACP sintetases (Kas) A e B (Figura 8). O processo completo também se configura como uma condensação de Claisen.

Figura 8 – Vias de biossíntese dos ácidos micólicos a partir de ácidos graxos em Mtb



Biossíntese, inibição e regulação de AMs em *Mycobacterium* spp. A via de AM inicia-se com a síntese *de novo* e o alongamento de AGs, catalisados pelas sintases FAS-I e FAS-II. Os produtos da FAS-II sofrem alongamento adicional e modificações para produzir os precursores de cadeia longa. A carboxilação da acil-CoA (os produtos da FAS-I) gera o alquilmalonato, e a sua condensação com cadeias mero produz o β-cetoéster que, após redução, resulta no AM maduro.

Fonte – Adaptado de (Marrakchi; Lanéelle; Daffé, 2014)

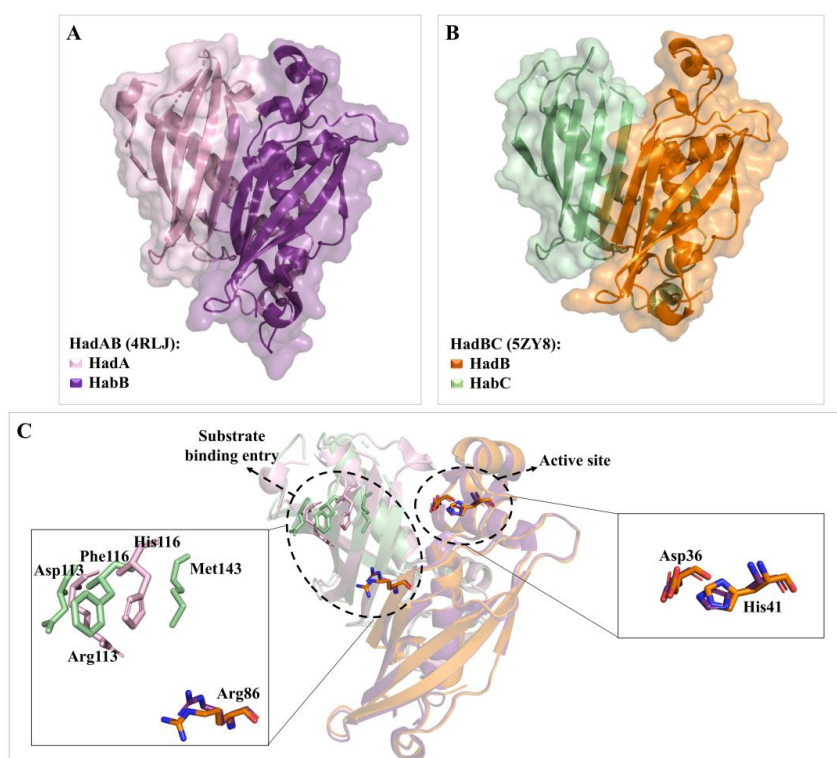
Dessa forma, uma abordagem viável para impedir a sobrevivência do bacilo é inibir a biossíntese de AMs, uma vez que se trata de um lipídio que o hospedeiro não produz. Para isso, busca-se o desenvolvimento de fármacos inibidores, os quais caracterizam-se como moléculas capazes de ligar-se ao alvo de interesse, impedindo a ligação de seu substrato natural, e, conseqüentemente, bloqueando sua atividade.

No contexto de Mtb, um alvo molecular de interesse são as enzimas do sistema FAS, em específico, as desidratases que participam da terceira etapa do FAS-II. As

desidratases (HadA, HadB, HadC), codificadas pelo mesmo conjunto de genes, cujas proteínas se arranjam em heterodímeros HadAB ou HadBC para desempenhar diferentes funções na síntese de AMs. Em estudos mais recentes um novo dímero foi descoberto, o HadD que, diferente dos demais, é codificado por outro gene, sendo ele também capaz de se heterodimerizar com HadB para formar um complexo (Bories et al., 2024; Lefebvre et al., 2020).

O dímero HadA possui a sequência de aminoácidos responsável pela atração e ligação do substrato, sendo eles o Arg86, Arg113, Asp113, His116, Met143 e Phe116 (Figura 9C). Enquanto o dímero HadB possui os aminoácidos His41 e Asp36, responsáveis pela atividade catalítica da enzima (Figura 9C). O heterodímero HadAB participa do início do ciclo, dando origem a AGs de tamanho intermediário; para isso, ambos os dímeros, compostos de folhas α e β , se conectam por ligações intermoleculares e assumem uma conformação de “cachorro-quente” dupla (Figura 9A). Enquanto o outro heterodímero (HadBC) está envolvido nos processos finais do ciclo, gerando cadeias alifáticas mais longas (Figura 9B) (De Melo Milani et al., 2024; Dong et al., 2015; Singh et al., 2022a).

Figura 9 - Estrutura cristalográfica dos heterodímeros HadAB e HadBC de *Mycobacterium tuberculosis*



Estruturas cristalográficas da β -hidroxiacil-ACP desidratase. A) Complexo HadAB (PDB ID 4RLJ); B)

Complexo HadBC (PDB ID 5ZY8); C) Sobreposição dos complexos HadAB e HadBC, em que os círculos pretos tracejados representam as regiões de ligação do substrato e o sítio ativo, com os aminoácidos críticos envolvidos.

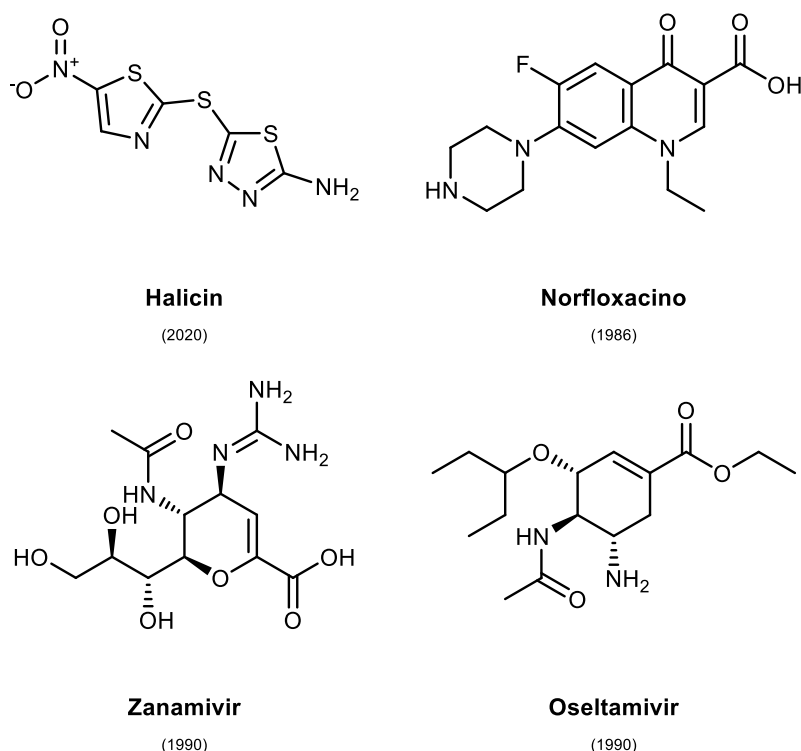
Fonte - (De Melo Milani et al., 2024).

As desidratases, portanto, configuram-se como alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos inibidores de suas atividades. Tendo com objetivo final a inibição da biossíntese de AMs, como já é visto em fármacos consolidados para o tratamento da TB, como a INH (inibição da InhA) (Figura 8). Ainda, as enzimas Hads não possuem representantes similares no corpo humano, permitindo a idealização de inibidores sem desencadear efeitos tóxicos para o paciente (Bibens et al., 2023; Singh et al., 2022c)

1.3 METODOLOGIAS DE DESCOBERTA DE FÁRMACOS AUXILIADAS POR COMPUTADORES

O conceito das metodologias de descoberta de fármacos auxiliadas por computadores (do inglês *Computer-Aided Drug Discovery*, CADD) foi idealizado primeiramente nos anos de 1960 por Hansch e colaboradores; entretanto, só nos anos 1980 a ideia ganhou força no campo de estudo de descoberta de fármacos como uma estratégia de economia de tempo e recursos. Desde então, as técnicas de CADD têm sido constantemente atualizadas para abranger mais abordagens e metodologias inovadoras. Assim, uma nova vertente paralela ao CADD ganhou força: o desenvolvimento de fármacos auxiliado por inteligência artificial (do inglês *Artificial Intelligence Drug Design*, AIDD), com o objetivo de criar e analisar bancos de dados de moléculas e suas atividades biológicas (Wang et al., 2024). Em 2020, a AIDD teve seu primeiro grande marco com o desenvolvimento na descoberta da molécula Halicin (Figura 10), um potente antimicrobiano (Stokes et al., 2020)

Figura 10 - Exemplos de moléculas com potente atividade antimicrobiana descobertas por meio de metodologias computacionais



Fonte – Autora, 2026.

Assim, as metodologias de CADD podem apresentar duas abordagens distintas: o desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura (do inglês *Structure-Based Drug Design*, SBDD) e o desenvolvimento de fármacos baseado no ligante (do inglês *Ligand-Based Drug Design*, LBDD) (Serhan, 1996). O LBDD, por focar na estrutura do ligante, permite a aplicação à descoberta de fármacos em alvos cuja estrutura não está elucidada, utilizando-se de técnicas de modelos farmacofóricos baseados no ligante e de estudos de relação estrutura-atividade quantitativa 3D (do inglês *3D Quantitative Structure-Activity Relationship*, 3D QSAR). Isso desencadeou, em 1986, a descoberta do antimicrobiano norfloxacin (Figura 10) (Wang et al., 2024). Ao contrário, as metodologias de SBDD necessitam da estrutura do alvo molecular para aplicar suas diferentes técnicas, como o *docking* molecular e a dinâmica molecular. Sendo esses altamente importantes na década de 1990 para a descoberta de dois fármacos com atividade antiviral, o zanamivir e o oseltamivir (Figura 10) (Ferreira et al., 2015; Kalyaanamoorthy; Chen, 2011; Wang et al., 2024).

Nesse contexto, o *docking* molecular, concebido em 1982, é uma metodologia que permite o estudo de interações em nível atômico entre moléculas e seu alvo,

permitindo estimar o encaixe e a força de interação entre elas (Kuntz et al., 1982). Para que isso ocorra, essa metodologia é sustentada por dois pilares principais: a função de busca e a de pontuação.

De modo geral, os algoritmos de pontuação podem ser divididos em dois grandes grupos. O primeiro deles baseia-se em uma metodologia sistemática, que irá realizar diferentes modificações conformacionais, exaurindo as possibilidades de novas torsões e mantendo em vista os aspectos físico-químicos de cada nova estrutura para evitar uma “explosão combinatória” do espaço amostral. Um exemplo dessa metodologia é o algoritmo de construção incremental. Enquanto as metodologias estocásticas realizam modificações aleatórias no ligante ou na população do ligante, como se vê em algoritmos genéticos e de Monte Carlo. (Goodford, 1985; Jones et al., 1997; Ma; Ajibade; Zou, 2024; Oshiro; Kuntz; Dixon, 1995).

Os algoritmos genéticos padrões processam a pose do ligante como um cromossomo, composto de genes, que correspondem aos graus de liberdade do ligante. A partir dessa analogia, nele podem ocorrer mutações ou *crossover*, resultando em um novo cromossomo, ou seja, uma nova pose do ligante, que é pontuada para ser descartada ou para passar para a próxima geração. Assim, o processo é repetido até a seleção da melhor pose do ligante. Dessa forma, trata-se de uma metodologia que utiliza conceitos da teoria da evolução de Darwin e da genética mendeliana, sendo implementada em *softwares* como o *Genetic Optimization for Ligand Docking* (GOLD). Entretanto, quando se baseiam na teoria fenotípica de Jean Batiste de Lamarck, os algoritmos genéticos são chamados de *Larmarkianos*. Lamarck postulava que traços fenotípicos adquiridos durante a vida do indivíduo poderiam ser transferidos para sua prole; assim, nos algoritmos, antes da “transferência gênica” ocorrem a otimização da população e o posterior *crossover*. Esse algoritmo genético é amplamente utilizado atualmente no *software* AutoDock (Agu et al., 2023; Ma; Ajibade; Zou, 2024; Meng et al., 2011; Morris et al., 1998; Rodrigues, 2016; Verdonk et al., 2003).

Em suma, as funções de busca procuram realizar uma pesquisa entre todas as conformações possíveis que o ligante pode assumir no sítio do alvo e escolher a que for mais energeticamente favorável, ou seja, a que se adequa melhor tridimensionalmente (posição, conformação e configuração) ao alvo.

Enquanto as funções de pontuação são responsáveis por calcular, por meio de

equações matemáticas, uma pontuação que estima a afinidade ou o ajuste do complexo ligante-alvo molecular (Paggi; Pandit; Dror, 2024; Wang et al., 2024). Essas pontuações podem advir de diferentes metodologias, tais como os empíricos, que são resultantes da soma de vários parâmetros energéticos individuais favoráveis, como ligação de hidrogênio, interação iônica, entropia de ligação e efeito hidrofóbico, podendo haver penalização por parâmetros que prejudiquem o reconhecimento molecular, como, por exemplo, repulsão eletrostática (Böhm, 1998; Head et al., 1996). Outro exemplo são as funções de pontuação baseadas em campos de força clássicos que realizam a somatória de interações não-ligantes, eletrostáticas e de Van Der Waals, sendo cada interação estimada por uma fórmula matemática diferente e estipulando-se um valor de corte e de importância de acordo com a distância delas em relação ao alvo (Carlson; Jorgensen, 1995; Kollman, 1993; Meng et al., 2011; Paggi; Pandit; Dror, 2024). No contexto de *softwares* disponíveis no mercado o GOLD emprega diferentes sistemas de pontuações, nesse caso o ChemScore e ChemPLP baseiam-se em funções empíricas, o GoldScore em campo de força e a ASP (*Astex Statistical Potential*) em funções baseadas em conhecimentos estatísticos do Banco de Dados de Proteínas (do inglês *Protein Data Bank*, PDB). Enquanto o AutoDock baseia-se puramente em funções empíricas (Jones et al., 1997; Liebeschuetz; Cole; Korb, 2012; Mooij; Verdonk, 2005; Morris et al., 1998; Verdonk et al., 2003).

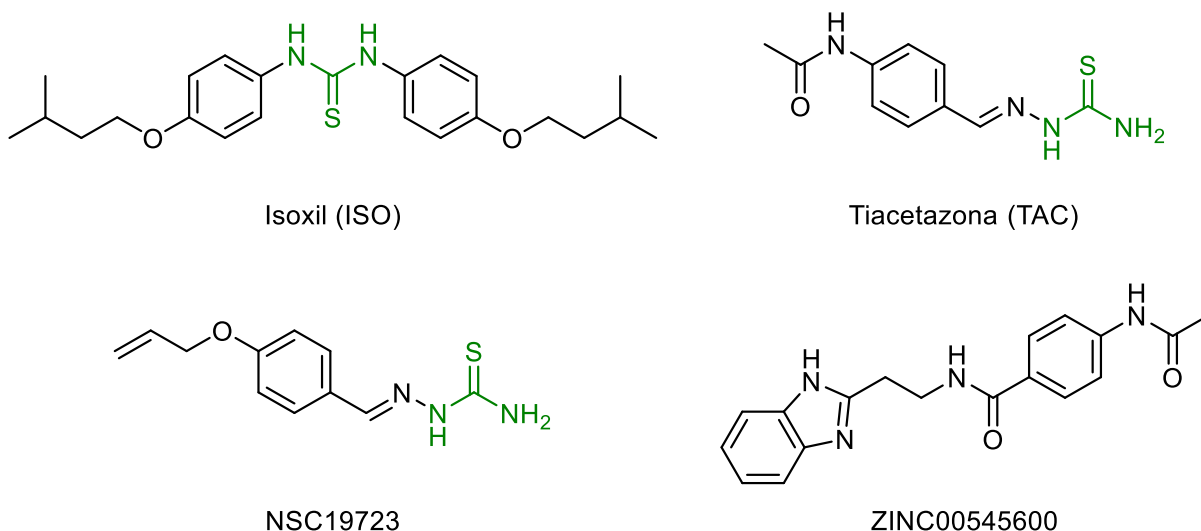
1.4 ENZIMA HAD DE MTB COMO POTENCIAL ALVO MOLECULAR

Como demonstrado anteriormente, o arcabouço estrutural de *M.tuberculosis* é altamente vantajoso para a sua sobrevivência no hospedeiro e contra os antibióticos. Devido a isso, cada vez mais buscam-se alvos moleculares diretamente ligados à biossíntese de componentes da parede celular, como é o caso da enzima HadAB. Uma das razões deve-se à ausência de enzimas correlatas na espécie humana, diminuindo os possíveis efeitos adversos que o fármaco pode causar ao paciente. Além disso, entre as espécies de *Mycobacterium* há uma alta porcentagem de conservação de tais enzimas, permitindo o avanço nos tratamentos de doenças para além da TB.

Em 1960, foi introduzido um fármaco contra TB denominado isoxil (ISO) ou tiocarlida (CIM = 1,0 – 2,5 µg/mL) (Figura 11). Entretanto, seu uso foi logo depois

interrompido devido à baixa absorção, e, conseqüentemente, fraca biodistribuição. Apesar disso, atualmente ele permanece como um dos principais expoentes do grupo das tioureias no que tange ao tratamento de TB, gerando estudos para elucidar seu mecanismo de ação. Diversas teorias ligam a atividade desse composto à inibição da biossíntese de AMs por meio da ligação covalente com a Cys61 do dímero HadA. Entretanto, sua atividade é dependente de uma ativação prévia por meio da oxidação do enxofre por uma flavina monooxigenase (EthA), classificando o ISO como pró-fármaco (Korduláková et al., 2007; Laborde; Deraeve; Bernardes-Génisson, 2017; Phetsuksiri et al., 1999; Rego et al., 2018).

Figura 11 – Estruturas de moléculas (destaque em verde para o grupamento tiourea) com atividade inibitória frente à enzima HadAB de *Mycobacterium tuberculosis*



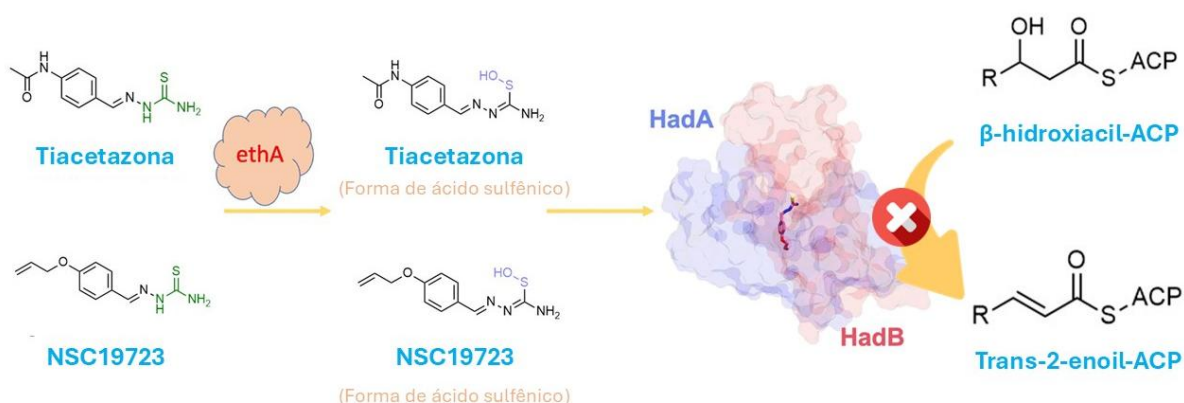
Fonte – Autora, 2026.

Além desse, a tiacetazona (TAC) (CIM = 1,56 – 3,12 μM) (Figura 11), fármaco de segunda linha da TB, também é um pró-fármaco da classe das tioureias com um mecanismo semelhante ao do ISO. Devido a isso, mutações no resíduo de Cys61 da HadA impedem a ligação do fármaco à enzima, ocasionando a resistência. Para isso, Machaba e colaboradores (2017) modificaram a estrutura da TAC ao trocarem o enxofre por oxigênio ou a amida por hidroxila, gerando uma série de compostos que foram avaliados *in silico* frente à enzima HadAB mutante. Resultando em um *hit* da série oxigenada, o composto ZINC00545600 (Figura 11), com uma pontuação acima das demais e mais interações hidrofóbicas com os aminoácidos do sítio ativo quando comparado a TAC, o que comprovou prover, em simulações de dinâmica molecular,

uma maior estabilidade nesse complexo (Abate; Koivula; Hoffner, 2002; Machaba et al., 2017). Tais achados abrem caminho para uma série de novos estudos que permitam contornar a resistência à TAC em cepas mutantes.

Singh e colaboradores (2022) demonstraram que o composto NSC19723 (Figura 11), selecionado a partir de uma triagem de 5000 moléculas pequenas de um banco de dados, apresenta uma atividade inibitória (CIM = 0,39 – 0,78 μ M) frente a *M.bovis* BCG e *M.tuberculosis* H₃₇R_v. O composto NSC19723 (**Figura 12**) é tiosemicarbazona de benzaldeído derivada de TAC, possuindo um mecanismo de ação semelhante ao inibir o complexo HadAB (Figura 12), porém apresentando uma atividade inibitória mais efetiva que seu precursor. Ainda, atua melhor em combinação com INH do que a TAC, e se provou eficaz em diminuir carga bacteriana em modelos de camundongos BALB/C (Singh et al., 2022b).

Figura 12 - Mecanismo de ação do composto TAC e de seu derivado NSC19723

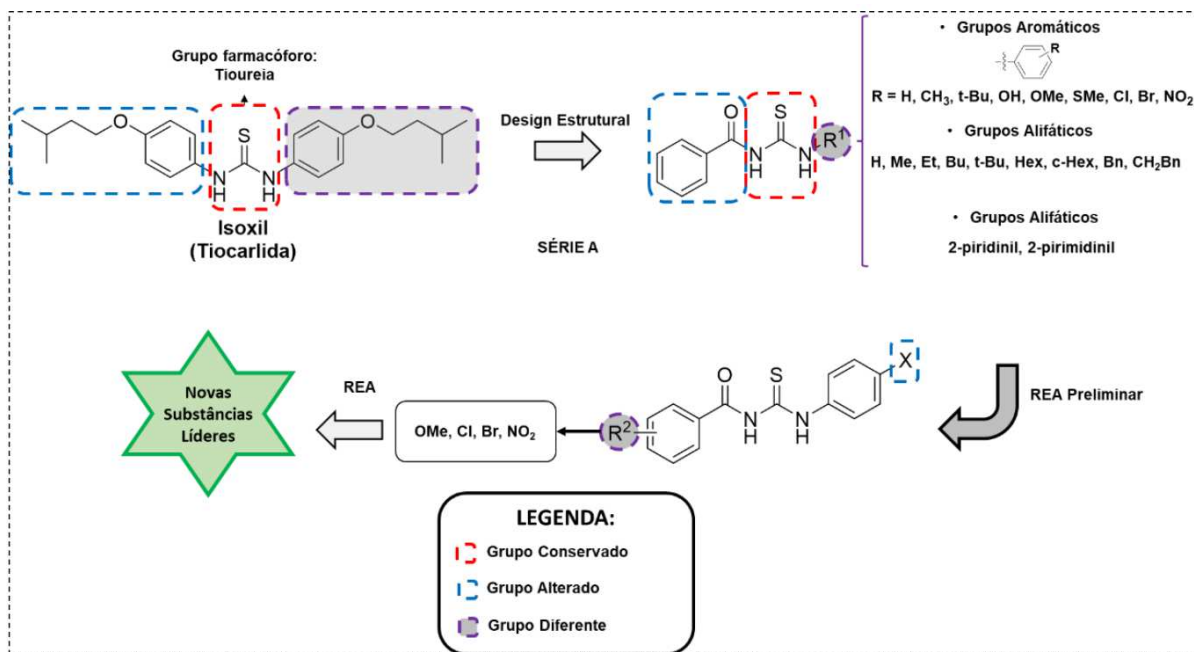


Fonte – Adaptado de (Singh et al., 2022b)

De Melo Milani (2024) realizou uma triagem virtual de 99 benzoiltioureas oxidadas, gerando as estruturas de seus respectivos ácidos sulfênicos e seus estereoisômeros, em busca das moléculas que apresentassem os melhores parâmetros *in silico* de inibição frente à enzima MtbHadAB. As benzoiltioureas (Figura 13) utilizadas foram idealizadas e sintetizadas por Brito et al. (2020) a partir de um estudo de relação estrutura-atividade (REA), a qual visa analisar quais componentes da molécula são responsáveis por sua atividade biológica e a partir desse arcabouço propor novas moléculas. O REA teve como base a estrutura do ISO, tendo em vista que seu grupo farmacofórico tiourea possui uma extensa atividade antimicrobiana já relatada na literatura (Reddy et al., 2011). As análises de Brito et al (2020) resultaram

em 53 moléculas que foram inseridas na quimioteca do Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais (LaSMMed).

Figura 13 - REA empregado para construção das 53 benzoiltioureas da quimioteca do LaSMMed



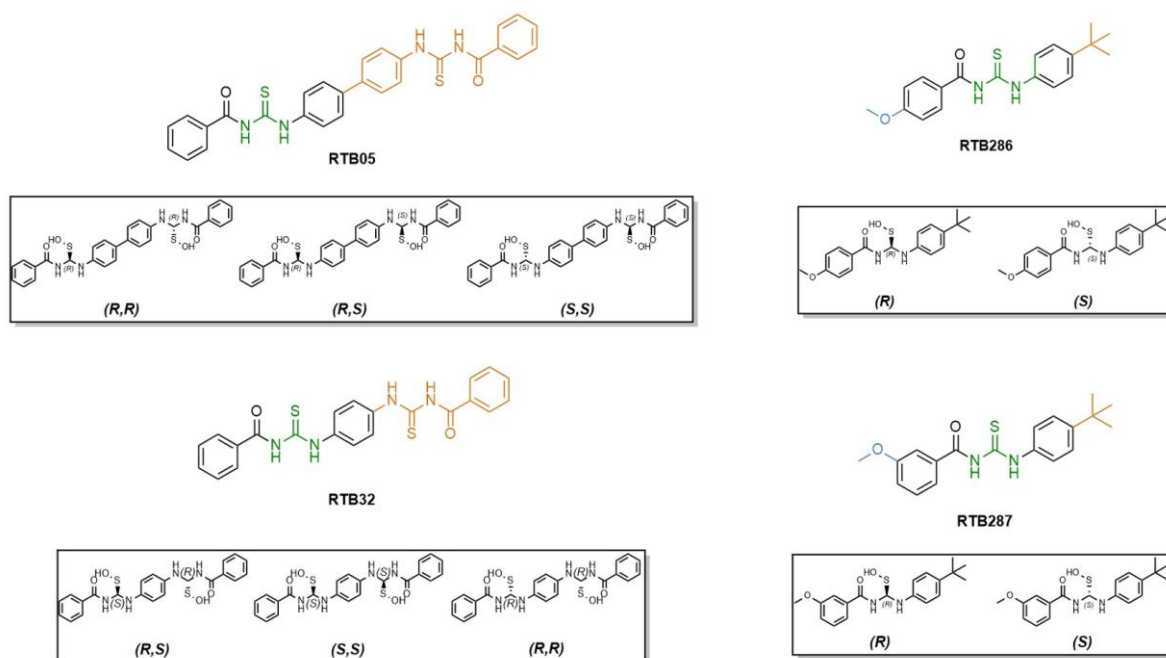
Fonte - (De Melo Milani, 2024)

Entre essas, quatro benzoiltioureas (**RTB05**, **RTB32**, **RTB286** e **RTB287**) (Figura 14) apresentaram os melhores parâmetros de *fitness score* (FS) em comparação ao ligante co-cristalizado e as demais moléculas foram selecionadas. Este é um parâmetro que infere o encaixe da molécula no sítio do alvo molecular, isto é, maiores valores indicam uma maior possibilidade de interação com o sítio catalítico. Isso se provou nos estudos de interação ligante-alvo, no qual todas apresentaram ao menos uma interação com os aminoácidos do sítio catalítico (Asp36 e His41) da HadAB. Dessa forma, o presente trabalho se propõe a dar continuidade à pesquisa iniciada por De Melo Milani (2024) passando para os testes *in vitro* em Mtb.

Os processos fisiológicos e bioquímicos ocorrem principalmente em ambiente aquoso, antagonizando completamente a hidrofobicidade das tioureas selecionadas, reflexo sobretudo de seu grande esqueleto carbônico. De fato, De Melo Milani (2024), por meio de variação de uma matriz de água:dimetilsulfóxido (DMSO) demonstrou a insolubilidade das moléculas em sistemas que apresentavam uma maior proporção aquosa. Tais achados são condizentes com os valores de cLogP, obtidos por meio da

plataforma SwissADME, entre 2,70 e 3,73, apesar de já apresentarem um valor melhor em comparação à ISO (cLogP = 4,18). No intuito de contornar esse problema, propomos o emprego de sistemas de entrega de fármacos, como os lipossomas, uma vez que sua porção lipídica consegue interagir com a molécula e englobá-la, melhorando a sua solubilidade em água.

Figura 14 - Estruturas das tioureias **RTB05**, **RTB32**, **RTB286** e **RTB287** selecionadas pela triagem virtual realizada por De Melo Milani (2024). Nos retângulos abaixo das estruturas estão representados os seus respectivos ácidos sulfênicos bem como os estereoisômeros gerados a partir da oxidação da porção toureia



Fonte – Autora, 2026.

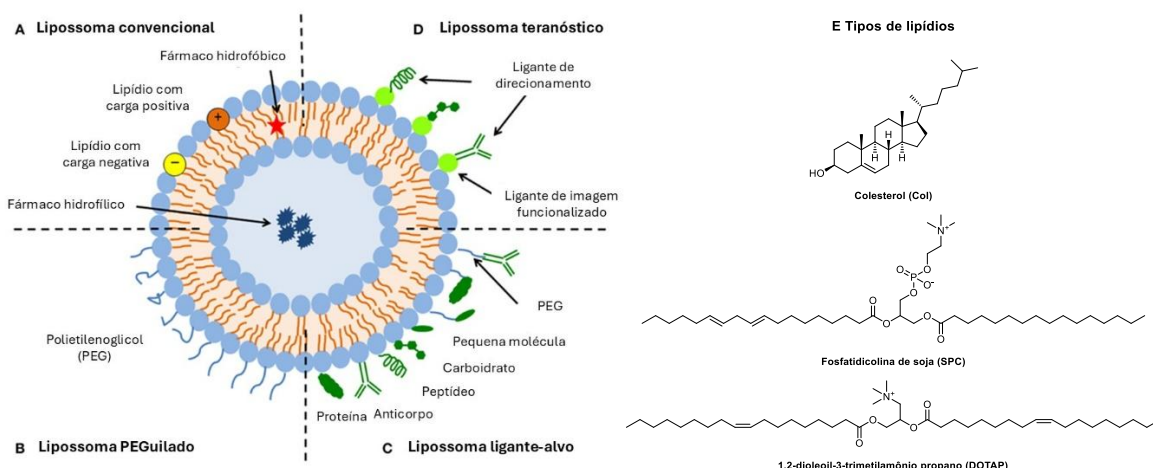
1.5 SISTEMA DE ENTREGA DE FÁRMACOS – LIPOSSOMAS

Além das dificuldades inerentes ao esquema terapêutico, a fisiopatologia da TB também constitui um empecilho devido à baixa permeabilidade nos granulomas, reduzindo a biodisponibilidade do fármaco e aumentando as chances de eliminação antes de alcançar o alvo. Para isso, sistemas de entrega de fármacos (do inglês *Drug Delivery Systems*, DDS), nanopartículas de polímeros ou lipídios constituem uma alternativa atrativa para a TB (Allen; Cullis, 2004).

Os lipossomas, vesículas de fosfolipídios em dispersão coloidal aquosa, foram primeiramente descritos em 1965 por Alec Bangham e colaboradores (Bangham; Standish; Watkins, 1965). Sua utilização ganha destaque por serem biocompatíveis e possuírem grande versatilidade em encapsular biomoléculas e moléculas sintéticas (Torchilin, 2005). Além de promover uma proteção adicional para a molécula, também são utilizados para melhorar tanto a solubilidade de moléculas altamente hidrofóbicas quanto seus parâmetros de toxicidade (Guo; Huang, 2014; Lee, 2020). Dessa forma, durante o encapsulamento, substâncias hidrofóbicas se agregam passivamente na camada lipídica, enquanto substâncias hidrofílicas concentram-se no meio aquoso, sendo necessária uma metodologia ativa de inserção do fármaco (Dolphin; Chowdhary; Shariff, 2003).

Para isso, a particularidade de cada lipídio pode alterar drasticamente a estrutura e as propriedades físico-químicas do lipossoma, dessa forma eles podem ser classificados por seu tamanho, carga, ligantes e pH (Figura 15) (Nsairat et al., 2022). De acordo com o tamanho, ainda podem se subdividir em vesículas multilamelares (500 – 5.000 nm), que possuem bicamadas lipídicas concêntricas ou uma única bicamada. As últimas ainda podem ser classificadas como pequenas (< 100 nm), grandes (100 – 1.000 nm) e gigantes (> 1 µm) (Nsairat et al., 2022; Torchilin, 2005). Vesículas menores (100 – 150 nm) podem transitar pelas fenestras dos capilares sanguíneos e são mais prováveis de serem fagocitadas, enquanto, as que possuem entre 50 e 100 nm chegam a evadir o sistema imune e a eliminação (Kraft et al., 2014; Merino; Zalba; Garrido, 2018). No epitélio pulmonar, devido às fenestras dos alvéolos apresentarem uma abertura de 35 nm, para garantir a passagem, é necessário vesículas ainda menores (Danaei et al., 2018; Townsley et al., 1988).

Figura 15 – Esquema demonstrando os diferentes tipos de sistemas de liberação lipossomais



Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas lipossomais de liberação de fármacos. (A) Lipossoma convencional: os lipossomas consistem em uma bicamada lipídica, composta por fosfolípidos catiônicos, aniônicos ou neutros e colesterol, que envolve um núcleo aquoso. Tanto a bicamada lipídica quanto o espaço aquoso podem incorporar compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, respectivamente. (B) Lipossoma PEGilado: as características e o comportamento *in vivo* dos lipossomas podem ser modificados pela adição de um revestimento polimérico hidrofílico, o polietilenoglicol (PEG), à superfície do lipossoma, conferindo estabilização estérica. (C) Lipossoma direcionado por ligante: os lipossomas podem ser usados para direcionamento específico pela ligação de ligantes (por exemplo, anticorpos, peptídeos e carboidratos) à sua superfície ou à extremidade terminal das cadeias de PEG ligadas. (D) Lipossoma teranóstico: Um único sistema consiste em uma nanopartícula, um elemento de direcionamento, um componente de imagem e um componente terapêutico. (E) Exemplos de lipídios empregados em lipossomas.

Fonte – Adaptado de (Sercombe et al., 2015)

Ademais, no que tange aos ligantes, eles podem possuir, em suas vesículas, moléculas inertes biocompatíveis (ex.: polietilenoglicol, PEG), como nos lipossomas de circulação prolongada, que ajudam a evadir a opsonização pelo sistema imune e, conseqüentemente, aumentam o tempo de meia-vida. Ou podem ser imuno-específicos, possuindo anticorpos em sua extensão, permitindo o direcionamento dos fármacos ao seu alvo (Torchilin, 2005). Dessa forma, na literatura, lipossomas visando alvos pulmonares normalmente utilizam-se de colesterol, dicetilfosfato, fosfatidilcolina, e distearoil fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (Donnellan; Giardiello, 2019; Ibrahim Bekraki, 2020). O colesterol (Col) (Figura 15) é o lipídio mais amplamente utilizado; parte disso se deve à sua acessibilidade e biocompatibilidade. Porém ele também realiza o controle do efeito de empacotamento da bicamada, ao alinhar sua hidroxila com a cabeça polar de outros lipídios e suas cadeias carbônicas com a calda dos lipídios, o que fornece para a bicamada fluidez e aumenta a viscosidade das extremidades polares. Geralmente, lipídios insaturados conferem esse efeito às vesículas, enquanto lipídios saturados aumentam a rigidez

da bicamada. Nesse contexto, a fluidez da bicamada pode ser definida como a facilidade com que seus componentes se movem e se rotacionam. A conformação das hidroxilas e cabeças polares permite ao colesterol controlar a fluidez e permeabilidade da membrana, evitando a interação e a incorporação de moléculas externas, contribuindo para a estabilidade geral da vesícula e a entrega controlada do seu conteúdo (Lombardo; Kiselev, 2022a; Nongkhlaw et al., 2025).

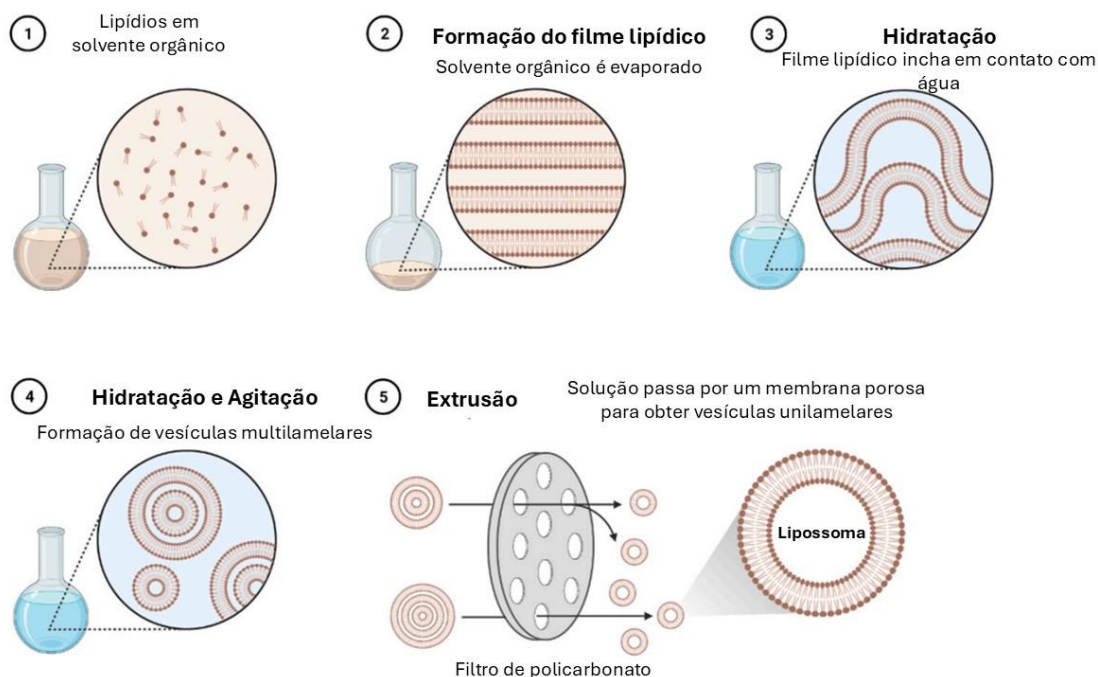
Lipossomas também podem possuir cargas negativas, positivas ou neutras, a depender da composição lipídica (Nongkhlaw et al., 2025). Os fosfolipídios são constituídos de uma calda apolar e uma cabeça polar, na qual se concentram as cargas das moléculas (Lima et al., 2021). Assim, lipossomas aniônicos apresentam grupos negativos na extremidade, como sulfatos e fosfatos, e lipossomas catiônicos apresentam grupos positivos, como amônio quaternário ou aminas, como é o caso da 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano (DOTAP) (Nongkhlaw et al., 2025). Lipossomas de carga positiva possuem ampla aplicação no encapsulamento de biomoléculas de carga negativa, como DNA e RNA, no tratamento de células tumorais, por apresentarem afinidade por capilares angiogênicos, e em doenças do sistema nervoso central, por conseguirem ultrapassar a barreira hematoencefálica (Dass, 2003; Majzoub; Ewert; Safinya, 2016; Youn; Chen; Furgeson, 2014).

No caso da TB, lipossomas catiônicos podem surgir como uma alternativa visto que, primeiramente, os fosfolipídios já compõem naturalmente os surfactantes presentes no pulmão, logo facilitam sua difusão e não são tóxicos (Labiris; Dolovich, 2003). Ainda, sua carga facilita a interação com o endotélio celular, sendo esta mediada por glicoproteínas dessas membranas, o que aumenta seu tempo de meia-vida (Miller et al., 1998). Além disso, se interagirem com partículas aniônicas circulantes, como proteínas, estas formam agregados que estimulam a fagocitose, promovendo o acesso direto ao alvo intracelular nos macrófagos (Allen; Cullis, 2004). Entretanto, a cautela é necessária, uma vez que cargas excessivamente positivas podem agregar-se de forma descontrolada a componentes aniônicos, reduzindo sua biodisponibilidade no sítio-alvo. Outra vantagem é que a solução de lipossomas catiônicos tende a ser estável devido à repulsão entre as cargas. Assim, um dos lipídios mais empregados na produção desse tipo de lipossoma é o DOTAP (Figura 15) (Lombardo; Kiselev, 2022a).

Por fim, seguindo a teoria da elasticidade de bicamadas lipídicas de Helfrich, a formação de vesículas requer uma inserção de energia no sistema; assim sendo, é

um processo ativo (Akbarzadeh et al., 2013). Este pode ser realizado por meio de diversas técnicas, cada uma com suas especificidades, como por hidratação do filme lipídico (método de Bangham), por injeção de solventes, por remoção de detergentes, por evaporação de fase reversa, entre outros (Lombardo; Kiselev, 2022a). A hidratação de filme lipídico é a mais simples dentre elas e consiste na adição de lipídios solubilizados em um solvente orgânico a um recipiente, seguida da evaporação do solvente, o que forma o filme lipídico. Em seguida, a solução aquosa é adicionada e, sob agitação e aquecimento, formam-se as vesículas (Figura 16). Esse método resulta em vesículas multilamelares que, por meio de um sonificador, podem ter seu tamanho reduzido a vesículas unilamelares (Choudhury et al., 2025; Pinheiro et al., 2011).

Figura 16 - Metodologia de produção de lipossomas por hidratação do filme lipídico



Fonte – Adaptado de (Basak; Das, 2025)

Dessa forma, os lipossomas foram obtidos a partir da metodologia de hidratação do filme lipídico que, apesar de ser simples, provêm uma boa eficiência de encapsulação, principalmente para moléculas hidrofóbicas (Lombardo; Kiselev, 2022a). Entretanto, é importante ressaltar que se trata de um método que requer a esterilização da solução final; porém, metodologias que atinjam esse propósito de forma eficiente ainda não são encontradas. Atualmente a produção de soluções

lipossomais estéreis em larga escala ainda é um desafio, visto que a sua composição pode ser afetada pelos métodos tradicionais de esterilização, como por meio do calor seco ou úmido, o qual pode levar à hidrólise e à desnaturação, e a radiação gama (γ) ou ultravioleta, que pode causar a peroxidação ou a perda das propriedades dos lipídios. Além destes, metodologias químicas, como a utilização de óxido de etileno, também são ineficientes (Araki et al., 2018; Delma et al., 2021a; Toh; Chiu, 2013). Cherdchom *et al* (2025), demonstrou que a irradiação UV-Vis em soluções lipossomais, apesar de causar alterações químicas mínimas, foi capaz de alterar a atividade biológica delas. Ainda, demonstrou que, a depender dos lipídios presentes, a esterilização na autoclave diminui a estabilidade da solução e piora os parâmetros de citotoxicidade (Cherdchom et al., 2025). Dessa forma, as opções difundidas de esterilização baseiam-se na filtração da solução ou a sua produção/manuseio em um ambiente o mais estéril possível. Entretanto, a filtração requer uma membrana esterilizante (0,22 μ m), não sendo aplicável para vesículas que excedem esse tamanho (Delma et al., 2021b; Lombardo; Kiselev, 2022a). Além disso, estudos demonstram que essa metodologia pode conduzir uma redução de hidrocarbonetos da estrutura final do lipossoma (Cherdchom et al., 2025).

A utilização das técnicas de encapsulamento já pode ser verificada nos métodos convencionais de tratamento da TB, como RIF e PZA, que ao serem encapsulados em lipossomas aerolizados tiveram melhor acesso ao alvo nos alvéolos e apresentaram menos efeitos adversos (Rojanarat et al., 2012; Vyas et al., 2004). Enquanto Nongkhilaw e colaboradores (2025) formularam lipossomas contendo OX-23, promissora molécula antimicrobiana (CIM = 1,56 μ M), mantendo a atividade *anti-M.tuberculosis*. Além disso, para TB óssea crônica, lipossomas contendo RIF, incorporada numa estrutura 3D de cimento de cálcio fosfato, já são estudados para melhorar a biodisponibilidade desse fármaco (Jin et al., 2025).

Em conclusão, a utilização de lipossomas já é amplamente difundida como metodologia de apoio ao tratamento da TB.

2 OBJETIVOS

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de derivados de benzoiltioureias em *M.tuberculosis* e em seguida realizar análises *in silico* visando identificar novas moléculas com potencial atividade inibitória da enzima MtbHadAB.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Determinar *in vitro* o efeito inibitório em *M.tuberculosis* de benzoiltioureias selecionadas por meio de triagem virtual previamente realizada

- Encapsular as substâncias em lipossomas catiônicos;
- Caracterizar os lipossomas obtidos;
- Realizar o doseamento do fármaco encapsulado nos lipossomas;
- Determinar a metodologia de concentração inibitória mínima para Mtb.
- Realizar os ensaios *in vitro* para as substâncias livres e encapsuladas.

2.1.2 Realizar estudos *in silico* para identificar novos compostos com atividade inibitória da enzima HadAB e analisar suas interações alvo-ligante e os *parâmetros de fármaco-similaridade*.

- Preparar a estrutura da proteína e seu ligante co-cristalizado.
- Realizar o procedimento de validação de metodologia por *redocking*.
- Preparar as benzoiltioureias e verificar seus estados de ionização e seus estereoisômeros.
- Realizar o *docking* molecular e selecionar os melhores complexos.
- Analisar as interações alvo-ligante e os parâmetros de fármaco-similaridade.
- Selecionar as moléculas mais promissoras para o encapsulamento e conduzir novos ensaios *in vitro*.

3 METODOLOGIA

3.1 ENCAPSULAMENTO EM LIPOSSOMAS

3.1.1 Preparo das Soluções Estoque

As soluções lipídicas foram preparadas em clorofórmio (Sigma-Aldrich) nas seguintes concentrações: fosfatidilcolina de soja (SPC) (15,5 mmol/L), Col (54,3 mmol/L) e DOTAP (34,3 mmol/L). Concomitantemente, as soluções das moléculas de interesse foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) a uma concentração de 10 mmol/L. Todas as soluções foram armazenadas a -18 °C.

3.1.2 Hidratação de Filme Lipídico

Os lipossomas catiônicos foram elaborados por meio da metodologia de hidratação de filme lipídico, seguindo a proporção 4,5:2,5:3 de SPC:DOTAP:Col, obtendo-se a concentração final de 1 mmol/L. Assim, para a preparação de 1 mL de solução de lipossomas, foram adicionados 7,28 µL da solução de DOTAP, 29 µL de SPC e 5,54 µL de Col a um balão de fundo redondo de 25 mL. O solvente presente foi evaporado sob nitrogênio. Após a secagem completa, foram adicionados 0,9 mL de água destilada sobre o filme lipídico e 0,1 mL da solução estoque da molécula. A solução foi submetida a banho ultrassônico por 15 min, em seguida, ficou por 30 min (intercalando 1 min de agitação e 1 min de descanso em ciclos de 30% de amplitude) em um homogeneizador ultrassônico Q500 (20 kHz, 500 W, QSonica) sob banho de gelo.

3.1.3 Caracterização dos Lipossomas

O equipamento Litesizer 500 (Anton Paar) foi utilizado para as medidas de espalhamento dinâmico de luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*, DLS), que resultam em valores de tamanho médio e potencial zeta. Todas as medidas foram

feitas à temperatura ambiente, em diluição 1:1 (0,5 mL da solução de lipossoma e 0,5 mL de água ultrapura), visando, no mínimo, 60% de transmitância.

3.1.4 Doseamento das Moléculas

3.1.4.1 Espectro de varredura

As substâncias foram solubilizadas em 1:1 (água destilada: DMSO) com concentração final de 50 µmol/L. Utilizando-se das técnicas de espectrofotometria UV-Vis, um espectro de absorção foi construído no intervalo de 250 nm a 500 nm de comprimento de onda (λ). A partir desses, o λ de maior absorção foi determinado para cada substância e, posteriormente, utilizado na construção das curvas de calibração.

3.1.4.2 Construção das curvas de calibração

A curva de calibração foi construída com sete pontos (de 5 a 35 µM) para cada molécula, aumentando-os em 5 µM. Para elas, utilizou-se uma matriz 1:1 de água destilada: DMSO, sendo o branco a matriz pura. As medidas de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro IL-593-BI (Kasuki) no λ de máxima absorção de cada molécula. A partir disso, foi gerada a equação da reta, considerando válidos apenas valores do coeficiente de correlação (R^2) acima de 0,95 (95%).

y : absorbância medida.

a : coeficiente angular da reta.

x : coeficiente linear da reta.

b : variável resposta.

$$y = ax + b$$

3.1.4.3 Eficiência de encapsulamento (EE)

Em um filtro de 10 kDa, foram centrifugados por 30 min 400 µL da solução de lipossoma. O filtrado foi recolhido e diluído em água destilada, em proporção 1:1, e em DMSO, em proporção 1:1. Devido à composição majoritariamente aquosa da

solução de lipossoma, o volume de filtrado foi considerado água no processo de diluição. Em seguida, a absorbância da solução foi medida no λ máximo no espectrofotômetro IL-593-BI (Kasuaki). Posteriormente, o valor obtido foi aplicado à fórmula do item 3.1.4.2, resultando na concentração final da solução. A eficiência de encapsulamento foi determinada pela aplicação do valor obtido à equação a seguir.

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

EE : resultado em %

C_i : concentração inicial (teórica).

C_f : concentração final.

3.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Uma cultura de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇R_v) foi estabelecida em ágar Lowenstein-Jensen a 37 °C por, no mínimo, 40 dias de incubação. Posteriormente, o bacilo foi suspenso em meio 7H11, composto de 7H10 (Sigma-Aldrich) suplementado com glicerol, casitona e Middlebrook OADC, até atingir uma densidade celular de 1 McFarland (DensiCHEK Plus, Biomérieux), que foi posteriormente diluído 1:25. Em seguida, as substâncias foram diluídas em meio 7H11 com concentração máxima de 1 mmol/L. Em uma placa de 96 poços, de fundo chato, foram adicionados 100 μ L de meio 7H11 em todos os poços das colunas 3 a 10, e de 200 μ L na coluna 11 para o controle negativo. Posteriormente, 100 μ L das substâncias diluídas foram adicionados às colunas 2 e 3, e a diluição seriada foi realizada das colunas 3 a 9. Por fim, 100 μ L da suspensão de *M.tuberculosis* diluída foram adicionados aos poços das colunas 2 a 10, sendo a última coluna o controle positivo. A placa foi vedada com Parafilm® e incubada por 7 dias a 37 °C. No sétimo dia, foram adicionados 50 μ L da solução reveladora de resazurina (0,01%) a todos os poços, e a placa foi incubada por 24 h. A revelação considerou a mudança de azul para rosa como indicativa de crescimento bacteriano. Para poços com coloração azul ou roxa, aguardou-se um adicional de 24 h para confirmar a leitura da placa.

3.3 ANÁLISES *IN SILICO*

Todas as metodologias *in silico* seguiram as especificações descritas por (De

Melo Milani, 2024).

3.3.1 Preparação do Alvo Molecular HadAB

A estrutura tridimensional da enzima HadAB de *M.tuberculosis* foi obtida a partir do PDB (<https://www.rcsb.org/>) sob o código 4RLT (resolução de 2,05 Å), a qual se encontrava cocrystalizada com o ligante Fisetina (FSE). Em seguida, no programa *Discovery Studio Visualizer* (v.2021), a proteína teve seus artefatos de cristalização, como o glicerol e as águas, retirados, exceto as quatro águas que participam do processo catalítico da enzima (HOH330, HOH339, HOH353 e HOH434).

3.3.2 Preparação dos Ligantes

As moléculas foram desenhadas no programa ChemDraw (v.17.0, Revvity Signals), em seguida, foram convertidas em suas estruturas 3D no Chem3D (v.17.0) e a energia de cada molécula foi minimizada com o método de força “MM2”. Todas as moléculas otimizadas foram salvas no formato de arquivo “*.mol2”. Posteriormente, os parâmetros de pKa, tautômeros e estereoisômeros foram verificados em pH 7,4 no programa MarvinSketch (v.25.3.51, Chemaxon).

3.3.3 Docking Molecular

A enzima previamente modificada foi adicionada ao programa GOLD (v.2025.1, Cambridge Structural Database), com a inclusão de todos os hidrogênios polares na estrutura da enzima. Em seguida, as ligações proteicas rotacionáveis foram fixadas e as águas mantidas (HOH330, HOH339, HOH353 e HOH434) foram configuradas da seguinte forma: “On” para Toggle, “Trans Spin” para Spin e a distância de 1,0 Å. As coordenadas de inserção no sítio catalítico foram determinadas com base na posição da FSE (x = -1,147762; y = 22,863333; z = -30,444619).

Os ligantes foram mantidos flexíveis e permitiu-se um raio de 15,0 Å no sítio de ligação, sendo submetidos a 10 execuções na função de pontuação GoldScore. A

classificação dos ligantes foi feita com base no maior valor de FS em cada execução. Os complexos das melhores soluções tiveram sua interação ligante-alvo analisada no *Discovery Studio Visualizer* (v.2021).

Para validação do protocolo, foi realizado um *redocking*, a partir do qual foram calculados os valores de desvio médio quadrático das posições atômicas (do inglês *Root Mean Square Deviation*, RMSD) entre a pose do ligante cocrystalizado e a pose redocada. Os valores de RMSD < 2,0 Å obtidos na função GoldScore validaram o protocolo estabelecido.

3.3.4 Análise das Propriedades de Fármaco Similaridade

As moléculas escolhidas tiveram seus parâmetros de fármaco-similaridade (do inglês, *druglikeness*) e de biodisponibilidade oral estabelecidos com o auxílio da plataforma online SwissADME (<https://www.swissadme.ch/index.php>, Swiss Institute of Bioinformatics).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENCAPSULAMENTO DAS **RTB 05**, **RTB32**, **RTB286** E **RTB287** EM LIPOSSOMAS

As moléculas a serem encapsuladas (**RTB05**, **RTB32**, **RTB286** e **RTB287**) foram selecionadas em um estudo de triagem virtual de De Melo Milani (2024) frente a enzima HadAB, sendo selecionadas as que apresentaram os melhores valores relacionados ao encaixe no sítio catalítico da enzima. Assim, a metodologia de hidratação de filme lipídico resultou na produção de vesículas multilamelares (do inglês *Multilamellar vesicles*, MLVs), que necessitaram ser diminuídos até formarem vesículas unilamelares; para isso, o método de sonicação foi utilizado. Uma vez prontos, os lipossomas foram caracterizados (tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão) por meio de DLS (Tabela 1).

Tabela 1 – Propriedades estruturais e elétricas dos lipossomas preparados

RTB	Tamanho Médio (nm)	Índice de Polidispersão (%)	Potencial ζ (mV)
05	277,98	23,37	43,06
32	477,03	24,22	46,16
286	867,56	20,60	42,30
287	466,46	24,86	44,36

Fonte – Autora, 2026.

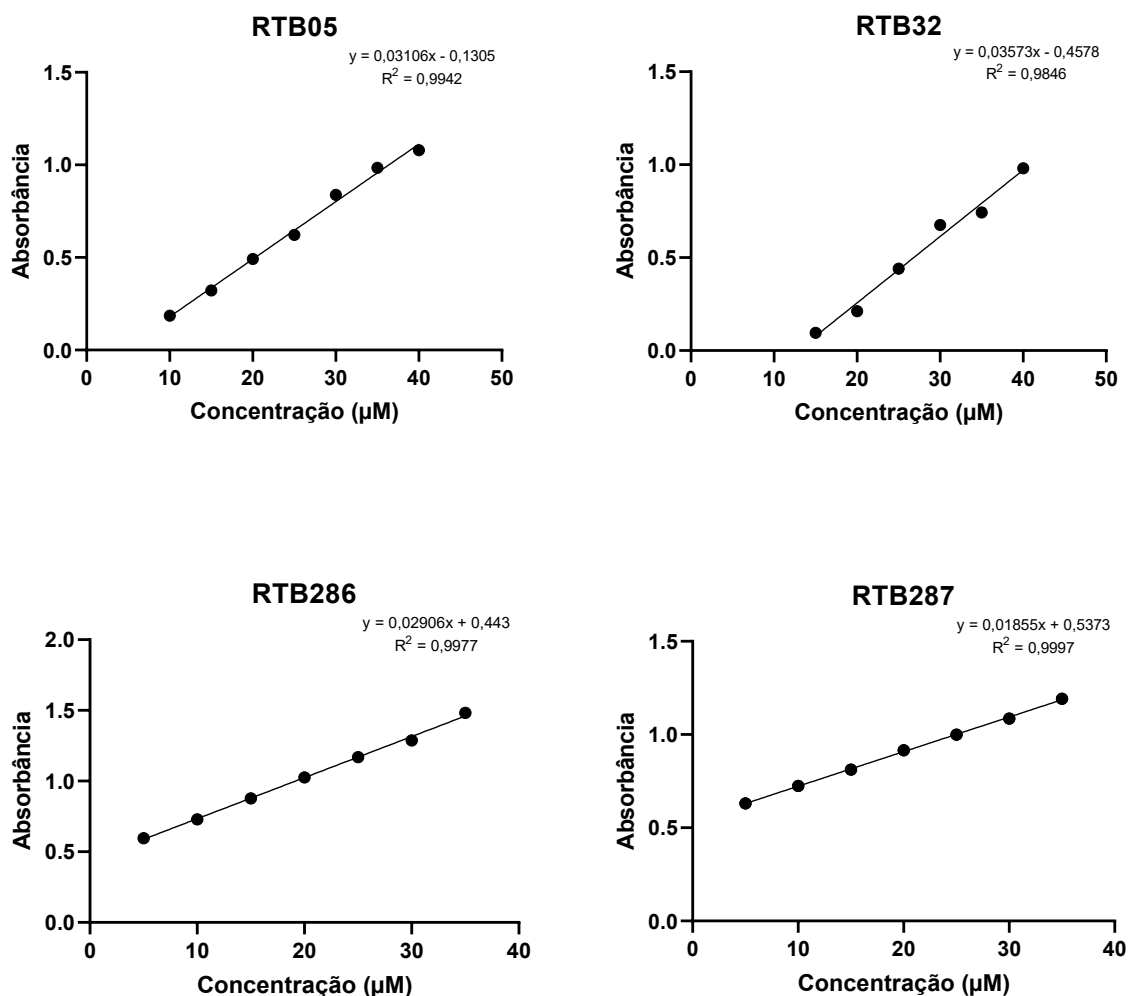
Para a caracterização foram utilizados três parâmetros, sendo eles: tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão. Estes podem ser utilizados para indicar se a metodologia empregada na produção dos lipossomas foi bem-sucedida, gerando uma população homogênea estável. Além de serem parâmetros importantes para futura aplicação dos lipossomas em sistemas *in vivo*. O tamanho dos lipossomas obtidos variou de 277,98 a 867,56 nm. Esses valores ainda se encontram acima do limiar adequado para a utilização em seres humanos, mesmo com a utilização do DOTAP, que tende a produzir lipídios mais compactos devido às suas forças de repulsão (Nongkhilaw et al., 2025). Uma das possíveis justificativas do tamanho, pode ser que a inclusão de colesterol no preparo de lipossomas eleve a média global de tamanho (Lee et al., 2005). No contexto *in vivo*, lipossomas maiores são mais facilmente detectados pelo sistema imune, levando a seu rápido metabolismo (Pinheiro et al.,

2011).

Já o potencial zeta (ζ) é uma propriedade que mede a carga presente na interface da nanopartícula dispersa em um meio, nesse caso, aquoso; consequentemente, ele pode ser altamente influenciado pela carga dos lipídios utilizados. Em outras palavras, as cargas determinam a repulsão eletrostática e a tendência de agregação do sistema. Esse parâmetro é essencial ser determinado, pois afeta a estabilidade da solução coloidal e suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, que influenciam a interação com as células do hospedeiro e a internalização do fármaco (Lombardo; Kiselev, 2022b; Nongkhlaw et al., 2025; Obiedallah et al., 2024). Assim, os valores obtidos variaram de 42,30 a 46,15 mV. Apesar de se encontrarem levemente acima, os potenciais ainda se aproximam do ideal. Segundo (Mansour et al., 2012), valores entre ± 30 mV podem ser considerados como uma solução coloidal estável. Além disso, potenciais positivos excessivamente elevados são mais danosos às células do que os negativos (Zhao et al., 2022).

Por fim, o índice de polidispersão mensura, por meio de uma equação matemática que considera dois parâmetros, a uniformidade da população de vesículas do sistema coloidal. Dessa forma, soluções monodispersas são populações homogêneas que apresentam uma formulação estável e segura, enquanto, a heterodispersão não é recomendada (Danaei et al., 2018). Transformando isso em dados, valores iguais ou abaixo de 0,2 (20%) são os mais comumente aceitos no manejo de lipossomas, enquanto, acima de 0,7 (70%) indicam uma solução altamente heterogênea (Clarke, 2013; Danaei et al., 2018). Assim, os lipossomas obtidos apresentam valores entre 20,60 e 24,86%, indicando uma solução monodispersa, ou seja, há uniformidade entre as vesículas.

Após a caracterização, também é importante realizar a dosagem do fármaco encapsulado para confirmar que a concentração teorizada foi atingida. Para isso, calcula-se a eficiência de encapsulação a partir da equação da curva obtida para cada composto (Figura 17).

Figura 17 - Curvas de calibração de **RTB05**, **RTB32**, **RTB286** e **RTB287**

Fonte – Autora, 2026.

Todas as curvas apresentaram um R^2 dentro dos parâmetros estipulados (> 95%), permitindo a dosagem adequada do fármaco. Nesse contexto, todos os compostos apresentaram EE entre 98% e 100%, permitindo que os lipossomas atingissem uma concentração vesicular próxima ao desejado (1 mM) (Tabela 2). A alta EE pode ser devida à natureza hidrofóbica das moléculas que lhes permite uma interação maior com a camada lipídica dos lipossomas e a não dispersão no conteúdo aquoso. Para os compostos **RTB05** e **RTB32**, um fator que pode ter influenciado a EE é a massa molar dos compostos, que é, respectivamente, 510,63 g/mol e 434,53 g/mol, sendo maior que a dos compostos **RTB286** e **RTB287** (ambos 342,46 g/mol) e o que pode dificultar o encapsulamento das moléculas.

Tabela 2 – Concentração teorizada e a corrigida dos lipossomas com base na eficiência de encapsulamento

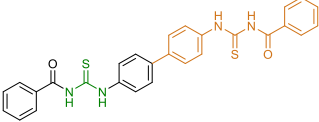
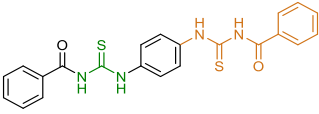
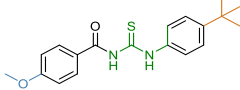
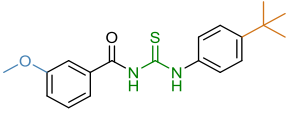
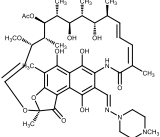
RTB	Concentração Teórica (mmol/L)	EE (%)	Concentração Corrigida (mmol/L)
05	1,0	98,54	0,9854
32	1,0	96,14	0,9614
286	1,0	103,04	1,0304
287	1,0	103,56	1,0356

Fonte – Autora, 2026.

4.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS **RTB 05, RTB32, RTB286** E **RTB287** EM MTB

Em seguida, os testes progrediram para os ensaios *in vitro* visando identificar a atividade anti-*M.tuberculosis* (Tabela 3). Além disso, como controles, foram realizados o controle de esterilidade, o controle de crescimento bacteriano, o controle da concentração de 10% de DMSO e, para os lipossomas, uma solução de lipossomas vazios. Sendo que tanto o DMSO quanto os componentes das vesículas, por si, não causaram danos ao crescimento bacteriano.

Tabela 3 - CIM das moléculas livres e encapsuladas frente a Mtb H₃₇R_v

		CIM (mM)
Experimental		05 > 1,0
		05_L > 1,0
		32 > 1,0
		32_L > 1,0
		286 > 1,0
		286_L > 1,0
		287 > 1,0
		287_L > 1,0
		RIF experimental 3,65 x 10 ⁻⁶

Literatura		RIF	$6,07 \times 10^{-5} - 1,21 \times 10^{-3}$
		(Palomino <i>et al.</i> , 2002)	
		INH	$7,29 \times 10^{-5} - 1,82 \times 10^{-3}$
		(Chauhan <i>et al.</i> , 2021)	

L = lipossomas.

Fonte – Autora, 2026.

Como observado acima, todas as substâncias, encapsuladas ou não, resultaram em CIM > 1,0 mM frente à cepa H₃₇R_v, sensível a todos os fármacos da TB. Esses valores encontram-se acima das concentrações desejadas para novos fármacos, visto que, como base de referência, os fármacos atuais empregados no tratamento da TB possuem CIMs relatadas na literatura de RIF = $6,07 \times 10^{-5} - 1,21 \times 10^{-3}$ mM e de INH = $7,29 \times 10^{-5} - 1,82 \times 10^{-3}$ mM (Chauhan *et al.*, 2021; Palomino *et al.*, 2002). Além dos valores de CIM da literatura, a RIF (Rifaldin®), obtida no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, teve sua CIM mensurada experimentalmente ($3,645 \times 10^{-6}$ mM), confirmando que a cepa utilizada é sensível a este antimicrobiano e sendo utilizada como o controle do antibiótico. Dessa forma, as substâncias não apresentaram atividade inibitória sobre *M.tuberculosis* nas concentrações analisadas.

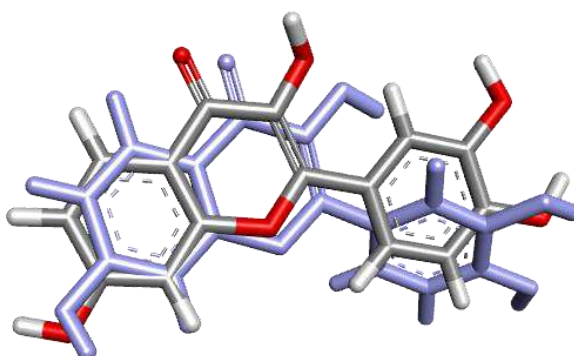
Inicialmente, nos estudos de estrutura-atividade, realizados por De Melo Milani (2024), foi proposta a atuação das benzoiltioureas como pró-fármacos que precisariam de uma oxidação prévia para então poder atuar na HadAB, dessa forma, todas moléculas foram desenhadas e triadas contendo um ácido sulfênico em sua estrutura. A partir dos resultados obtidos, é possível inferir que as moléculas poderiam não necessitar de ativação para atuar na HadAB e que a presença da oxidação superestimou as interações com o sítio catalítico e, consequentemente, a escolha das melhores moléculas para inibir essa enzima. Outro fator que diminuiu a acurácia do estudo foi a ausência de uma estrutura cristalográfica da enzima EthA, responsável pela oxidação da porção tioureia, logo, não foi possível estimar de antemão sua afinidade com as benzoiltioureas. Portanto, a hipótese de ativação por esta enzima baseou-se em dados obtidos para os mecanismos de outros derivados de tioureias, como o ISO.

4.3 DOCKING MOLECULAR DAS TIOUREIAS NÃO OXIDADAS

Nesse contexto, tornou-se necessária a realização de um novo *docking* molecular, mantendo-se o grupo tioureia sem oxidação. Para este, as treze benzoiltioureias que apresentaram os maiores valores de FS foram elencadas e preparadas em seu estado de menor energia (Tabela 4). É importante ressaltar que a presença do ácido sulfênico gerava um centro quiral nas moléculas utilizadas no trabalho anterior; portanto, a classificação da tioureia, sem quiralidade, considerou a média dos FS dos seus respectivos estereoisômeros.

Previamente ao *docking*, foi necessário realizar o processo de validação do protocolo para verificar se o programa (GOLD) consegue reproduzir a pose do ligante cocrystalizado obtida experimentalmente, nesse caso, a fisetina (FSE). Essa estimativa é feita com base no parâmetro RMSD, que indica, com valores inferiores de 2,0 Å, a capacidade da função de pontuação de simular a conformação e a orientação do ligante. Assim, seguindo todos os parâmetros das águas e de flexibilidade estabelecidos por De Melo Milani (2024), a função GoldScore foi validada, sendo ela baseada na soma de características físico-químicas das moléculas (Kontoyianni, 2017; Meng et al., 2011; Vieth et al., 1999). Como pode ser observado na Figura 18, há quase completa sobreposição entre a estrutura do ligante obtida experimentalmente e a do ligante gerado pelo programa, o que se refletiu no baixo valor de RMSD (1,20 Å).

Figura 18 – Estrutura do ligante cocrystalizado FSE e o ligante simulado pelo GOLD sobrepostas

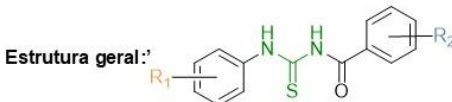


A estrutura em cinza representa o ligante cocrystalizado, e a em roxo, o ligante gerado pelo GOLD.
Fonte – Autora, 2026.

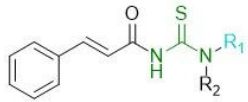
A partir disso, o *docking* molecular foi realizado para os ligantes previamente preparados, sendo importante acrescentar que estes não apresentaram tautômeros nem diferentes estados de protonação em pH 7,4, escolhido por ser o valor fisiológico do ser humano. Assim, os resultados dessa metodologia foram expressos em termos de FS, que representa a capacidade da estrutura dos ligantes de se encaixar no sítio ativo da enzima. Nesse caso, foram informadas as coordenadas de ancoramento da FSE, a partir das quais foi estabelecido um raio de 15 Å. Logo, maiores valores de FS indicam uma maior afinidade, enquanto o contrário também é verdadeiro. Os valores obtidos no presente *docking* variaram de 61,57 a 85,37, enquanto os de Melo Milani (2024) foram de 70,57 a 90,96 (Tabela 4). Para além do intervalo ser similar, as posições das moléculas não variaram significativamente, como se observa que a **RTB05** e a **RTB32** mantiveram suas posições no topo.

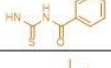
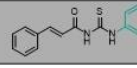
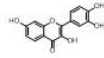
Tabela 4 - Comparação entre o ranking de *fitness score* obtido por docking molecular pelo presente trabalho e no de De Melo Milani (2024)

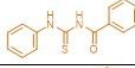
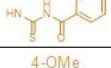
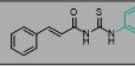
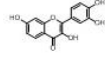
Estrutura geral:



→



RTB	R ₁	R ₂	FS
5		H	90,96
32		H	90,13
288	4- 	2-OMe	74,06
276	4- 	3-OMe	73,73
287	4- 	4-OMe	73,45
299	4-OMe	3-NO ₂ ,4-Cl	73,12
146	4-OMe	3-OMe	73,01
286	4- 	3-OMe	72,87
149	4-OH	3-OMe	72,79
RML 35			72,52
130	4-OMe	3-Cl	71,83
131	4-OH	3-Cl	70,92
140	4-OMe	2-Cl	70,57
Ligante  60,72			
(de Melo Milani, 2024)			

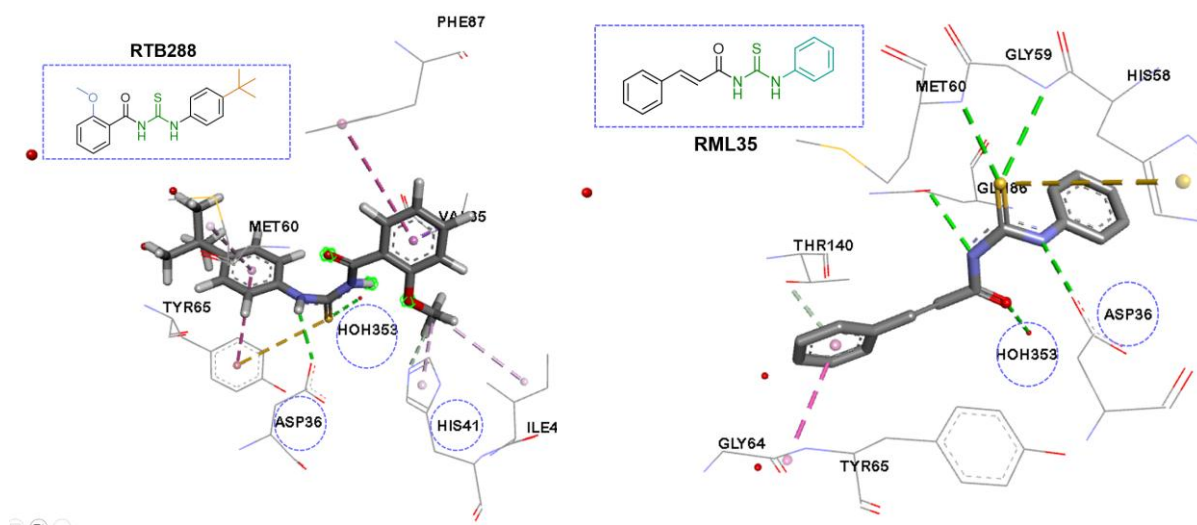
RTB	R ₁	R ₂	FS
5		H	85,37
32		H	80,78
299	4-OMe	3-NO ₂ ,4-Cl	67,02
288	4- 	2-OMe	66,91
146	4-OMe	3-OMe	66,20
130	4-OMe	3-Cl	65,29
140	4-OMe	2-Cl	64,04
286	4- 	3-OMe	63,65
276	4-Br	3-OMe	62,95
RML 35			62,67
287	4- 	4-OMe	62,38
149	4-OH	3-OMe	61,93
131	4-OH	3-Cl	61,57
Ligante  60,21			

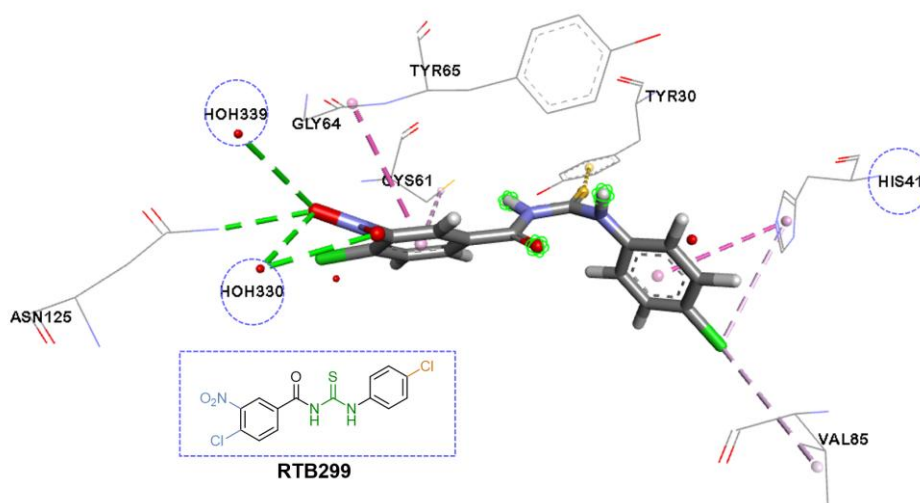
Pintado em cinza, representa a molécula com um diferente arcabouço estrutural, sendo ele derivado do ácido cinâmico.

Fonte – Autora, 2026.

Portanto, com base apenas nos valores de FS, não foi possível estabelecer um parâmetro de eliminação entre as moléculas; logo, todas as 13 passaram para as análises de interação ligante-alvo. Nessa etapa, dão-se às interações fortes, como ligações de hidrogênio, pois são elas que dão maior suporte para o reconhecimento molecular. Além disso, para o caso da MtbHadAB, já foi reportado previamente por (De Melo Milani, 2024; Dong et al., 2015) que os resíduos de água no sítio ativo (His41 e Asp36) participam do processo de reconhecimento molecular e permitem o desencadeamento da atividade catalítica, sendo eles HOH330, HOH339, HOH353 e HOH43. Tendo em vista isso, dentre as 13 estruturas, apenas três (**RTB288** e **RTB299** e **RML35**) foram capazes de interagir com as águas e os aminoácidos catalíticos, enquanto dentre as demais, a única molécula que se aproximou foi a **RTB130**, ao interagir com a His41 (Figura 19).

Figura 19 - Interações intermoleculares das **RTB288** e **RTB299** e **RML35** no sítio catalítico da MtbHadAB



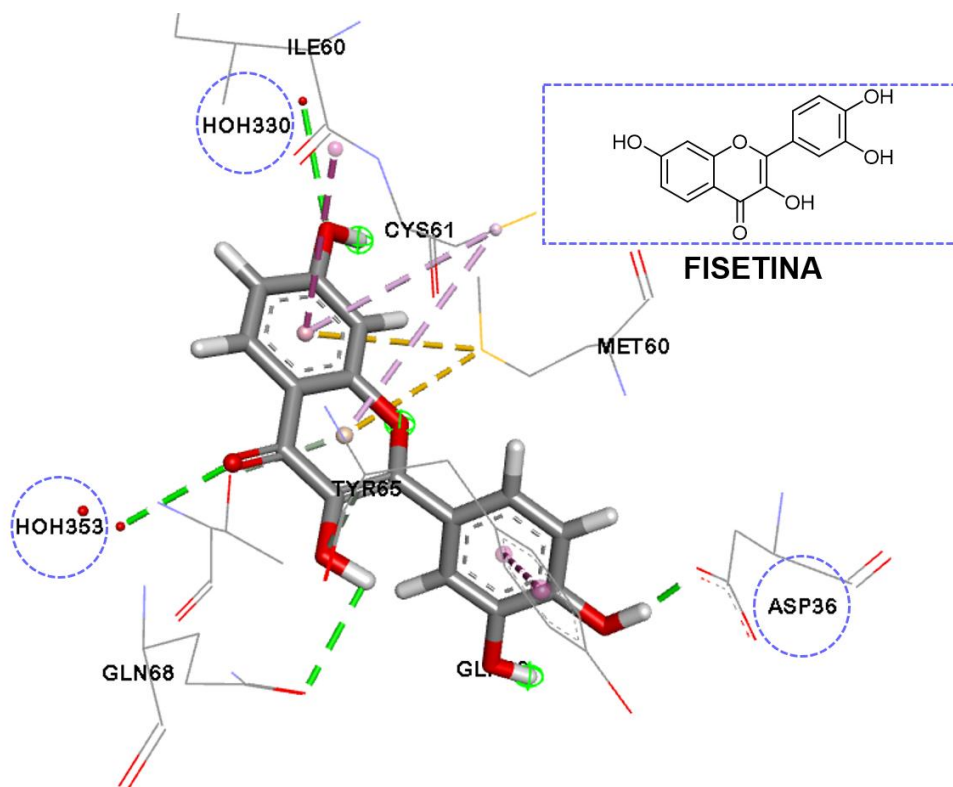


Fonte – Autora, 2026.

Assim, a **RTB288** interagiu com ambos os aminoácidos relevantes do sítio catalítico: uma ligação de hidrogênio do grupo tioureia ao oxigênio do Asp36 e uma interação pi-alquila do anel imidazólico da His41 ao carbono do grupo metoxila. Além de uma ligação de hidrogênio da água (HOH353) ao enxofre da tioureia. Já a **RTB299** realizou três ligações de hidrogênio com as águas HOH330 e HOH339, por meio dos oxigênios do grupo nitro. Além de duas interações com o anel imidazólico da His41, uma π -alquila com o átomo de cloro e a outra π - π em formato de T com o anel benzênico. Por fim, a **RML35**, diferente das demais, é um derivado do ácido cinâmico, por isso, difere no arcabouço estrutural. Assim, sua carbonila realizou uma ligação de hidrogênio com a água HOH353 e outra interação pi-enxofre do S da tioureia com o nitrogênio do Asp36.

Assim, como forma de comparação, a FSE (Figura 20) realizou duas ligações de hidrogênio com os resíduos de água, sendo, ambas no núcleo cromona, uma com a hidroxila do anel benzênico (HOH330) e a outra com a carbonila (HOH353). Enquanto a hidroxila do grupo catecol interagiu, por ligação de hidrogênio, com o oxigênio da Asp36. Logo, as interações no sítio catalítico observadas com as três benzoiltioureias (**RTB 288** e **299** e **RML35**) justificam a sua escolha como potenciais inibidores da enzima MtbHadAB.

Figura 20 - Interações intramoleculares do ligante co-cristalizado FSE com a MtbHadAB



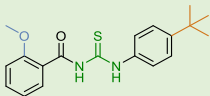
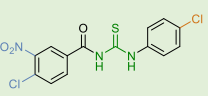
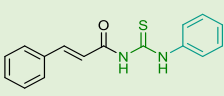
Fonte – Autora, 2026.

Uma vez escolhidas, as suas propriedades de fármaco-similaridade foram avaliadas na plataforma SwissADME. No campo de estudo de fármacos, o conceito de fármaco-similaridade constitui-se como importante, pois determina “características ideais” que um fármaco deve ter em termos de absorção por via oral. Esse conceito pode ser regido por diferentes regras, como as de Ghose, Egan, Muegge, entre outros. Os parâmetros abordados nesse trabalho seguirão as recomendações de Lipinski et al. (2001), com a extensão de Veber et al. (2002). Em 2001, Lipinski e colaboradores determinaram o que é chamado de “Regra dos Cinco”, as quais apresentam parâmetros ideais para um fármaco apresentar uma boa absorção, sendo esses: massa molecular (MM) < 500 g mol⁻¹, nº de aceptores de ligações de hidrogênio (nº.ALH) < 10; nº de doadores de ligações de hidrogênio (nº.DLH) < 5 e um logP < 5. Após um ano, Veber *et al*, apresentaram parâmetros adicionais à essa regra, acrescentando os valores de nº de ligações rotacionáveis ≤ 10 e *Topological Polar Surface Area* (TPSA) ≤ 140 Å². Quando se adequam todos esses parâmetros, espera-se que as moléculas apresentem boa absorção e, conseqüentemente, boa

disponibilidade oral (Lipinski et al., 2001; Veber et al., 2002).

Dessa forma, como observado na Tabela 5, todas as moléculas se adequaram aos parâmetros, sem violações. Além disso, quanto à absorção, todas as moléculas apresentariam alta absorção intestinal, parâmetro ideal para a formulação de fármacos de via oral.

Tabela 5 - Propriedades de Fármaco-similaridade, Absorção, Distribuição e Inibição da **RTB288**, **RTB299** e **RML35**

		RTB288 	RTB299 	RML35 
Fármaco-similaridade	MM (g/mol)	342,46	370,21	282,36
	nº.ALH	2	3	1
	nº.DLH	2	2	2
	LogP	4,29	3,34	3,31
	TPSA (Å²)	82,45	119,04	73,22
	nº.Rot	7	6	6
Absorção	Absorção intestinal	Alta	Alta	Alta
	Substrato da gp-P	Não	Não	Não
Distribuição	Perme.BHE	Não	Não	Sim
Inibição CYP450	CYP1A2	Sim	Sim	Sim
	CYP2C19	Sim	Sim	Sim
	CYP2C9	Sim	Sim	Sim
	CYP2D6	Não	Não	Não
	CYP3A4	Sim	Sim	Não

MM = massa molecular; nº ALH = número de aceptores de ligação de hidrogênio; nº DLH = número de doadores de ligação de hidrogênio; LogP = lipofilicidade; TPSA = área de superfície polar; nº Rot = número de ligações rotacionáveis; gp-P = glicoproteína; Perme. BHE = penetração na barreira hematoencefálica.

Fonte – Autora, 2026.

Ademais, todos foram classificados como não sendo substrato da glicoproteína-P (gp-P), macromolécula diretamente relacionada à resistência aos fármacos da TB. A gp-P é uma proteína transmembrana que atua como bomba de efluxo para transportar o fármaco do meio intracelular para o extracelular, reduzindo a concentração absorvida e contribuindo para a resistência. Portanto, , fármacos que não são substratos de gp-P, como os três avaliados, evitam ter sua taxa de absorção diminuída. Assim, como observado na figura 3, as proteínas gp-P também conseguem atuar em novos vasos sanguíneos, diminuindo a concentração dos medicamentos, entretanto, estudos ainda estão sendo desenvolvidos para determinar se a melhor abordagem é a terapia conjunta com um inibidor dessa bomba de efluxo (Huber; Maruiama; Almeida, 2010; Parida et al., 2024).

Por fim, os três compostos sinalizaram a inibição de diferentes CYPs (CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9) e **RTB288** e **RTB299** para a inibição da CYP3A4. Esses parâmetros devem ser analisados em estudos futuros, pois as CYP 2C19, 2C9 e 3A4 são as maiores responsáveis pelo metabolismo de fármacos antirretrovirais, e é sabido que, principalmente no Brasil, o nº de pacientes de TB com coinfeção de HIV é alto. Para além disso, outras interações medicamentosas devem ser estudadas para indivíduos usuários de polifarmácia, visto que a CYP450 é responsável por até 80% do metabolismo dos fármacos atualmente disponíveis (Gong et al., 2019; Zanger; Schwab, 2013).

4.4 ENCAPSULAMENTO DAS **RTB288**, **RTB299** E **RML35** EM LIPOSSOMAS

O encapsulamento das substâncias resultou em duas soluções lipossomais contendo vesículas de tamanho médios, como é o caso da **RTB299** (428,50 nm) e do **RML35** (623,10 nm) (Tabela 6). Entretanto, mudando drasticamente das demais, as vesículas da **RTB288** apresentaram tamanhos de 983,53 nm, abrindo margem para necessidade futura de realizar um passo adicional de extrusão visando reduzir as vesículas. Apesar disso, os demais parâmetros indicam que é uma solução estável (22,06 mV) e monodispersa (37,10%).

As demais soluções também apresentaram valores de potencial zeta que indicam estabilidade. Entretanto, o valor de polidispersão da solução lipossomal da **RML35** indica uma população altamente heterogênea, com um valor acima de 70%,

levantando uma possível diferença na concentração do fármaco encapsulado entre os diversos tamanhos de lipossomas. Chamando a atenção para uma possível alteração da metodologia de produção dos lipossomas, como a adição de uma etapa de extrusamento.

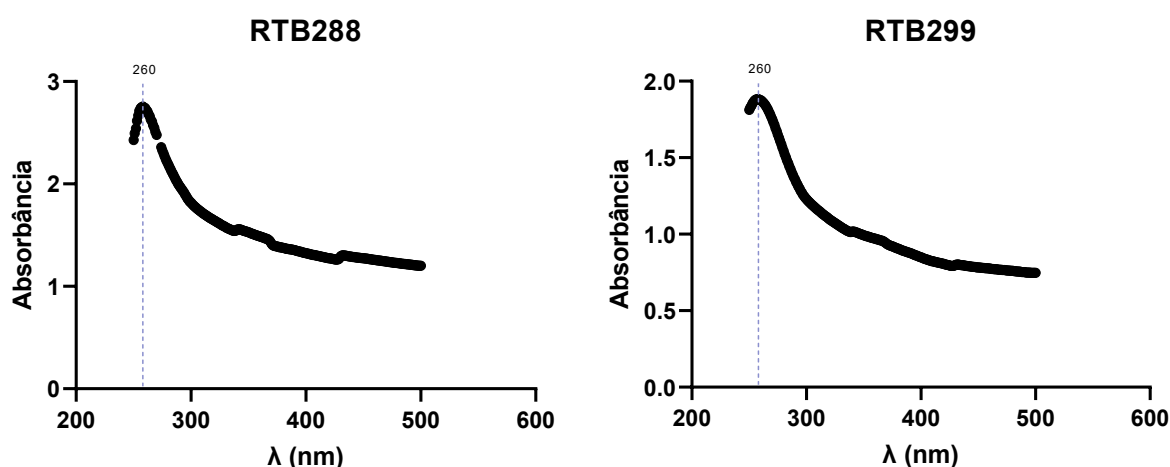
Tabela 6 – Propriedades estruturais e elétricas dos novos lipossomas preparados

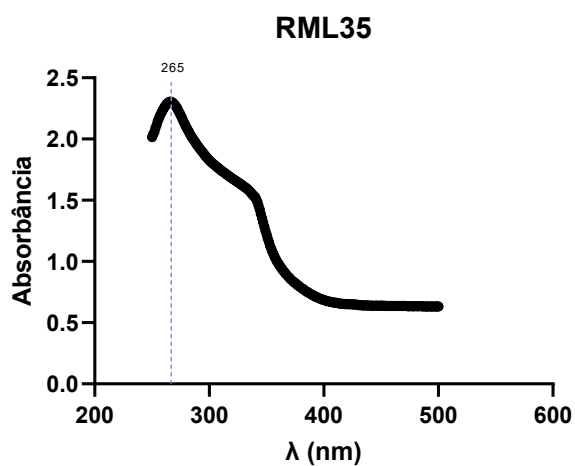
Composto	Tamanho Médio (nm)	Índice de Polidispersão (%)	Potencial ζ (mV)
RTB288	983,53	37,10	22,06
RTB299	428,50	23,50	24,80
RML35	623,10	79,60	27,56

Fonte – Autora, 2026.

Para dosar a quantidade encapsulada por cada lipossoma, primeiramente foi necessário estabelecer o comprimento de onda de maior absorção por meio de uma varredura (de 250 nm a 500 nm) para cada molécula (Figura 21). Resultando em 260 nm para ambas, **RTB288** e **RTB299**, e 265 nm para **RML35**.

Figura 21 – Espectro de varredura UV-Vis das moléculas **RTB288**, **RTB299** e **RML35** entre os comprimentos de onda de 250 a 500 nm

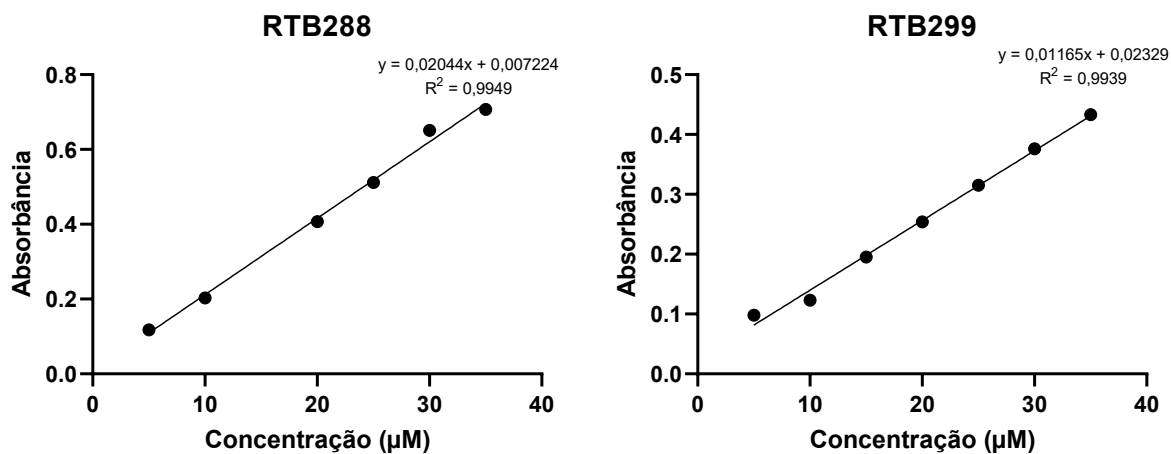


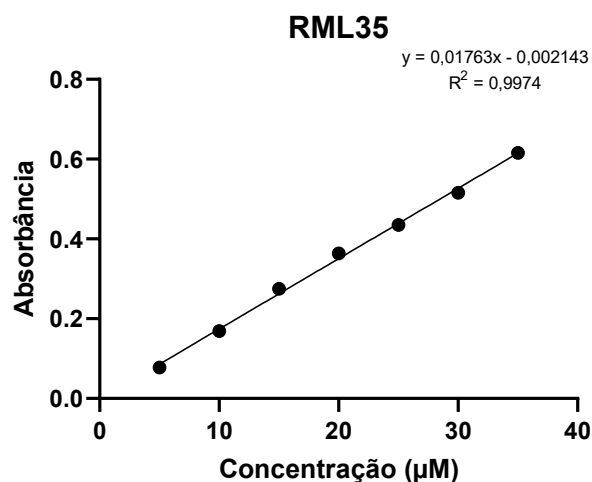


Fonte – Autora, 2026.

A partir disso, foi possível construir as curvas de calibração (Figura 22) para cada composto. Sendo que todas apresentaram coeficientes de correlação acima de 99%, indicando uma relação linear confiável.

Figura 22 - Curvas de calibração dos **RTB288**, **RTB299**, **RML35** para o posterior doseamento e EE





Assim, todas as três moléculas apresentaram EE entre 97,73% e 99,27%, demonstrando que houve menos de 10% de falha no processo de encapsulamento, chegando a uma concentração corrigida que se aproxima do desejado de 1 mM.

Tabela 7 – Concentração teorizada e a corrigida dos novos lipossomas com base na eficiência de encapsulamento

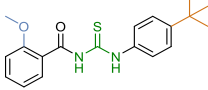
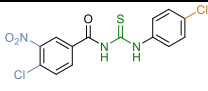
Compostos	Concentração Teórica (mmol/L)	EE (%)	Concentração Corrigida (mmol/L)
RTB288	1,0	99,27	0,9927
RTB299	1,0	98,05	0,9805
RML35	1,0	97,73	0,9773

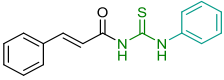
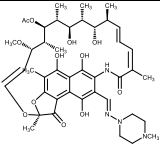
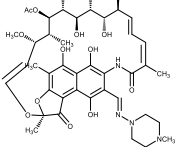
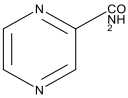
Fonte – Autora, 2026.

4.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA **RTB 288**, **RTB 299** E **RML 35**

Seguindo os mesmos protocolos anteriormente estabelecidos, as substâncias não encapsuladas foram testadas *in vitro* frente à cepa H₃₇R_v da TB, suscetível a todos os fármacos.

Tabela 8 - CIM da **RTB288**, **RTB299** e **RML35** frente a *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇R_v)

		CIM (mM)
Experimental		RTB288
		RTB299
		< 7,81x10 ⁻³
		< 7,81x10 ⁻³

		RML35	> 1,0
		RIF experimental	$3,65 \times 10^{-6}$
Literatura		RIF (Palomino <i>et al.</i> , 2002)	$6,07 \times 10^{-5} - 1,21 \times 10^{-3}$
		INH (Chauhan <i>et al.</i> , 2021)	$7,29 \times 10^{-5} - 1,82 \times 10^{-3}$

Fonte – Autora, 2026.

Como se vê na Tabela 8, o derivado do ácido cinâmico não apresentou atividade inibitória nas concentrações testadas; entretanto, as demais moléculas apresentaram boa inibição do crescimento, ficando abaixo do intervalo de concentrações utilizado. Dessa forma, testes futuros serão realizados para determinar a CIM de ambos os compostos, avaliar a encapsulação e verificar se a atividade é mantida. Por fim, ensaios de citotoxicidade em células de mamíferos (LLCMK2) serão realizados para todos os compostos, tanto encapsulados quanto livres, para determinar se o encapsulamento reduz o perfil tóxico das substâncias.

O processo de realização dos ensaios *in vitro* com os lipossomas tem sido dificultado pela falta de um processo estéril seguro de realização, levando a necessidade de refazer a solução toda vez que uma contaminação é encontrada. Visto que, mesmo com nosso lipossoma de menor tamanho (RTB05 = 277,98 nm), ainda não é aplicável a filtração com membrana estéril, sendo recomendada para vesículas menores que 200 nm. E, apesar do cuidado na produção, a contaminação é um risco grande por ser um sistema aquoso e que necessita ao final de um sonificador de haste, inviabilizando, por exemplo, a produção dentro de um fluxo laminar para impedir interferentes do ambiente. Assim, todo o processo de testagem *in vitro* é prolongado e acarreta um consumo maior de insumos.

Além disso, durante os ensaios preliminares de citotoxicidade foi possível notar um grande salto no valor das absorbâncias dos poços tratados com as substâncias encapsuladas, chegando ao triplo do valor dos poços de controle de crescimento celular. Ainda, apesar de não apresentar uma aparente contaminação sob

microscopia, é possível observar o acúmulo de sedimentos com aparência amarelada nos poços tratados, os quais diminuem com a concentração do lipossoma. É sabido que a composição do lipossoma interfere no seu processo de interação a membrana, nesse contexto, as vesículas catiônicas sofrem atração eletrostática das cargas negativas dos fosfolipídios da membrana, como o fosfatidilglicerol, permitindo uma melhor interação (Botet-Carreras et al., 2023; Stebelska et al., 2007). Apesar disso, alguns estudos sugerem que, devido ao fato de que os cristais de formazan são partículas lipídicas, esses são atraídos para os lipossomas; adentrando e acumulando neles. Posteriormente, ao serem endocitados o conteúdo é liberado promovendo um acúmulo desses cristais no citosol, aumentando sua agregação, levando a uma aparente maior viabilidade celular do que de fato existe (Angius; Floris, 2015; Stockert et al., 2012; Torchilin; Zhou; Huang, 1993). Entretanto mais estudos e experimentos são necessários para chegar a uma conclusão sob a natureza dos achados.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as moléculas (**RTB05**, **RTB32**, **RTB286** e **RTB287**), previamente selecionadas no trabalho de De Melo Milani (2024), foram encapsuladas com eficiência próxima de 100%. Possuem características de uma solução coloidal homogênea (20,60 a 26,86%) e estável (42,30 a 46,15 mV) com vesículas de tamanho variável para cada molécula, de 277,98 a 477,03 nm. Além disso, foi possível determinar que a concentração inibitória, tanto das substâncias livres quanto das encapsuladas, ficou acima de 1,0 mM, o que sugere que as essas, diferentemente do isoxil, não necessitariam de pré-ativação pela enzima EthA. Portanto, foi necessária a condução de um novo estudo *in silico* para revisar o ranking obtido no trabalho anterior, resultando em uma classificação com FS semelhante, sem variações notáveis nos valores obtidos. Nesse contexto, foram necessários estudos mais aprofundados da interação ligante-alvo para identificar quais moléculas apresentam maior potencial de interagir com os aminoácidos catalíticos e com os quatro resíduos de água ao redor. Assim, foram selecionadas três substâncias, **RTB288**, **RTB299** e **RML35**, que, além de apresentarem interações relevantes, também atenderam aos parâmetros de fármaco-similaridade e à alta absorção gastrointestinal preditos. Posteriormente, as moléculas foram encapsuladas resultando em lipossomas com tamanhos médios de 428,50 nm (**RTB299**), 623,10 nm (**RML35**) e 983,53 nm (**RTB288**), sendo necessário estudar a possibilidade de aplicar metodologias de extrusão. Ademais, todas soluções possuem uma estabilidade quanto a sua repulsão eletrostática (22,06 mV a 27,56 mV). Entretanto, diferentemente das demais, a **RML35** encapsulada apresentou uma população heterogênea (79,60%), ou seja, não apresentou uma uniformidade na amostra. Por fim, nos ensaios *in vitro*, as substâncias livres escolhidas tiveram seu potencial inibitório em *M.tuberculosis* se confirmado, levando a um CIM $< 7,8 \times 10^{-3}$ mM.

Em sua totalidade, ressalta-se a importância de estudos mais aprofundados para determinar as concentrações inibitórias do **RTB288** e do **RTB299**, além de se avaliar a citotoxicidade de todas as moléculas e das soluções lipossomais em células de mamíferos, a fim de determinar se o sistema de liberação reduz o impacto da toxicidade sobre o hospedeiro, visto que a abordagem representa uma solução à insolubilidade das presentes moléculas em soluções aquosas. Assim, visando à identificação de potenciais substâncias-protótipos para o tratamento de TB que

apresentem menos efeitos adversos e proporcionar melhor qualidade de vida para o paciente já debilitado.

REFERÊNCIAS

- ABATE, G.; KOIVULA, T.; HOFFNER, S. E. In vitro activity of thiacetazone on mycobacterial species belonging to the Mycobacterium tuberculosis complex. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 6, n. 10, p. 933–935, 2002.
- AGU, P. C. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13398, 17 ago. 2023.
- AKBARZADEH, Abolfazl *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 102, 22 dez. 2013.
- ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818–1822, 19 mar. 2004.
- ALSAYED, Shahinda S. R.; GUNOSEWOYO, Hendra. **Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug Targets. International Journal of Molecular Sciences** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2023.
- ANGIUS, Fabrizio; FLORIS, Alice. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 2, p. 314–319, mar. 2015.
- ARAKI, Ryo *et al.* Development of a novel one-step production system for injectable liposomes under GMP. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 6, p. 602–607, 3 jul. 2018.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-IN27, ago. 1965.
- BARRETO, Angela Maria Werneck *et al.* Adoecimento. *In: Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. [S.l.]*: Editora FIOCRUZ, 2014. p. 120–144.
- BASAK, Suman; DAS, Tushar Kanti. Liposome-Based Drug Delivery Systems: From Laboratory Research to Industrial Production—Instruments and Challenges. **ChemEngineering**, v. 9, n. 3, p. 56, 27 maio 2025.
- BHISE, S. B. **Isoniazid Toxicity** **J Drug Des Res.** [S.l.: S.n.].
- BIBENS, Laurie *et al.* A Review of Fatty Acid Biosynthesis Enzyme Inhibitors as Promising Antimicrobial Drugs. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, p. 425, 10 mar. 2023.
- BÖHM, Hans-Joachim. Prediction of binding constants of protein ligands: A fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database

search programs. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 12, n. 4, p. 309–309, jul. 1998.

BORIES, Pascaline *et al.* <scp>HadBD</scp> dehydratase from <scp>*Mycobacterium tuberculosis* </scp> fatty acid synthase type <scp>II</scp> : A singular structure for a unique function. **Protein Science**, v. 33, n. 4, 19 abr. 2024.

BOTET-CARRERAS, Adrià *et al.* On the uptake of cationic liposomes by cells: From changes in elasticity to internalization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 221, p. 112968, jan. 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Tuberculose**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.gov.br/saude>.

BRENNAN, Patrick J.; NIKAIIDO, Hiroshi. THE ENVELOPE OF MYCOBACTERIA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 29–63, jun. 1995.

BRITO, Tiago O. *et al.* Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 93–103, 16 jan. 2020.

CARLSON, H. A.; JORGENSEN, W. L. An extended linear response method for determining free energies of hydration. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, p. 10667–10673, 1995.

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

CHANDRA, Pallavi; GRIGSBY, Steven J.; PHILIPS, Jennifer A. **Immune evasion and provocation by Mycobacterium tuberculosis**. **Nature Reviews Microbiology**Nature Research, , 1 dez. 2022.

CHAUHAN, Aditi *et al.* **Comprehensive review on mechanism of action, resistance and evolution of antimycobacterial drugs**. **Life Sciences**Elsevier Inc., , 1 jun. 2021.

CHERDCHOM, Sarocha *et al.* Sterilization Effects on Liposomes with Varying Lipid Chains. **Nanomaterials**, v. 15, n. 19, p. 1478, 27 set. 2025.

CHOUDHURY, Anmol *et al.* Strategic advances in liposomes technology: translational paradigm in transdermal delivery for skin dermatosis. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 23, n. 1, p. 576, 21 ago. 2025.

CLARKE, Sarah. **Development of hierarchical magnetic nanocomposite materials for biomedical applications**. Dublin: Dublin City University, 2013.

DAFFÉ, Mamadou; DRAPER, Philip. The Envelope Layers of Mycobacteria with

Reference to their Pathogenicity. **Advances in microbial physiology**, v. 39, p. 131–203, 1997.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DASS, Crispin R. Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumour vasculature. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 267, n. 1–2, p. 1–12, nov. 2003.

DE MELO MILANI, Vinicius. **Estudos In Silico De Tioureias Como Potenciais Inibidores Da Enzima MtbHadAB e Encapsulamento Com Lipossomas**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2024.

DE MELO MILANI, Vinicius *et al.* Mycobacterial Targets for Thiourea Derivatives: Opportunities for Virtual Screening in Tuberculosis Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 29, p. 4703–4724, 20 fev. 2024.

DELMA, Kouka Luc *et al.* Sterilization methods of liposomes: Drawbacks of conventional methods and perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, p. 120271, mar. 2021a.

DELMA, Kouka Luc *et al.* Sterilization methods of liposomes: Drawbacks of conventional methods and perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, p. 120271, mar. 2021b.

DOLPHIN, David; CHOWDHARY, Rubinah K.; SHARIFF, Isha. Drug release characteristics of lipid based benzoporphyrin derivative. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v. 6, n. 1, p. 13–19, 2003.

DOMENECH, Pilar *et al.* Massive Gene Duplication Event among Clinical Isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* W/Beijing Family. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 18, p. 4562–4570, 15 set. 2010.

DONALD, P. R. *et al.* Droplets, dust and Guinea pigs: An historical review of tuberculosis transmission research, 1878-1940. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 22, n. 9, p. 972–982, 1 set. 2018.

DONG, Yu *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. 2015.

DONNELLAN, Samantha; GIARDIELLO, Marco. Nanomedicines towards targeting intracellular *Mtb* for the treatment of tuberculosis. **Journal of Interdisciplinary Nanomedicine**, v. 4, n. 3, p. 76–85, 9 set. 2019.

FERREIRA, Leonardo *et al.* Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.

FLYNN, JoAnne L.; CHAN, John. Immune cell interactions in tuberculosis. **Cell**, v. 185, n. 25, p. 4682–4702, dez. 2022.

GLICKMAN, Michael S.; COX, Jeffery S.; JACOBS, William R. A Novel Mycolic Acid Cyclopropane Synthetase Is Required for Cording, Persistence, and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Cell**, v. 5, n. 4, p. 717–727, abr. 2000.

GONG, Yuqing *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cytochrome P450 inhibitors for HIV treatment. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 417–427, 4 maio 2019.

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 849–857, 1 jul. 1985.

GUO, Shutao; HUANG, Leaf. Nanoparticles containing insoluble drug for cancer therapy. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 778–788, jul. 2014.

HEAD, Richard D. *et al.* VALIDATE: A New Method for the Receptor-Based Prediction of Binding Affinities of Novel Ligands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 16, 1996.

HERSHKOVITZ, Israel *et al.* Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. **Tuberculosis**, v. 95, n. S1, p. S122–S126, 1 jun. 2015.

HUBER, Paula C.; MARUIAMA, Cintia H.; ALMEIDA, Wanda P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148–2154, 2010.

IBRAHIM BEKRAKI, Ali. Liposomes-and niosomes-based drug delivery systems for tuberculosis treatment. *In: Nanotechnology Based Approaches for Tuberculosis Treatment*. [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 107–122.

JIN, Jie *et al.* Rifampicin liposomes loaded on calcium phosphate cement scaffold constructed using 3D printing technology for sustained drug release. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, 2025.

JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

KALIA, Nitin Pal *et al.* M. tuberculosis relies on trace oxygen to maintain energy homeostasis and survive in hypoxic environments. **Cell Reports**, v. 42, n. 5, 30 maio 2023.

KALYAANAMOORTHY, Subha; CHEN, Yi-Ping Phoebe. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 17–18, p. 831–839, set. 2011.

KANABALAN, Renuga Devi *et al.* Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics

approaches in host biomarkers discovery. Microbiological Research Elsevier GmbH, , 1 maio 2021.

KAUFMANN, Stefan H. E.; SCHAIBLE, Ulrich E. **100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. Trends in Microbiology**, out. 2005.

KOLLMAN, Peter. Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 7, p. 2395–2417, 1 nov. 1993.

KONTOYIANNI, Maria. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. **Methods in Molecular Biology**, v. 1647, p. 255–266, 2017.

KORDULÁKOVÁ, Jana *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.

KORZENIEWSKA-KOSELA, Maria *et al.* Tuberculosis in Young Adults and the Elderly. **Chest**, v. 106, n. 1, p. 28–32, 1994.

KRAFT, John C. *et al.* Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 1, p. 29–52, jan. 2014.

KUNTZ, Irwin D. *et al.* A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 269–288, out. 1982.

LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 588–599, 20 dez. 2003.

LABORDE, Julie; DERAEEVE, Céline; BERNARDES-GÉNISSON, Vania. 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.

LEE, Mi-Kyung. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 264, 13 mar. 2020.

LEE, Seung-Cheol *et al.* The Effect of Cholesterol in the Liposome Bilayer on the Stabilization of Incorporated Retinol. **Journal of Liposome Research**, v. 15, n. 3–4, p. 157–166, 9 jan. 2005.

LEFEBVRE, Cyril *et al.* Discovery of a novel dehydratase of the fatty acid synthase type II critical for ketomycolic acid biosynthesis and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2112, 7 fev. 2020.

LEUNG, Ann N. Pulmonary Tuberculosis: The Essentials. **Radiology**, v. 210, n. 2, p.

307–322, fev. 1999.

LIEBESCHUETZ, John W.; COLE, Jason C.; KORB, Oliver. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 6, p. 737–748, 28 jun. 2012.

LIMA, Pedro Henrique Correia de *et al.* Liposome surface modification by phospholipid chemical reactions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 237, p. 105084, jul. 2021.

LIN, Shou Yean Grace; DESMOND, Edward P. **Molecular diagnosis of tuberculosis and drug resistance**. **Clinics in Laboratory Medicine** W.B. Saunders, , 2014.

LIPINSKI, Christopher 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, Cui Hua; LIU, Haiying; GE, Baoxue. **Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion**. **Cellular and Molecular Immunology** Chinese Soc Immunology, , 1 dez. 2017.

LOMBARDO, Domenico; KISELEV, Mikhail 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, Domenico; KISELEV, Mikhail A. **Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application**. **Pharmaceutics** MDPI, , 1 mar. 2022b.

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

MA, Zhiwei; AJIBADE, Abeeb; ZOU, Xiaoqin. Docking strategies for predicting protein-ligand interactions and their application to structure-based drug design. **Communications in Information and Systems**, v. 24, n. 3, p. 199–230, 2024.

MACHABA, Kgothatso E. *et al.* Tailored-Pharmacophore Model to Enhance Virtual Screening and Drug Discovery: A Case Study on the Identification of Potential Inhibitors Against Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* (3R)-Hydroxyacyl-Acp Dehydratases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 10, p. 1055–1071, 20 jun. 2017.

MAJZOUB, Ramsey N.; EWERT, Kai K.; SAFINYA, Cyrus R. Cationic liposome–nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical,**

Physical and Engineering Sciences, v. 374, n. 2072, p. 20150129, 28 jul. 2016.

MANSOUR, Heidi M. *et al.* LIPID NANOPARTICULATE DRUG DELIVERY AND NANOMEDICINE. *In: Lipids in Nanotechnology*. [S.l.]: Elsevier, 2012. p. 221–268.

MARRAKCHI, Hedia; LANÉEELLE, Marie-Antoinette; DAFFÉ, Mamadou. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 1, p. 67–85, jan. 2014.

MENG, Xuan-Yu *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.

MERINO, María; ZALBA, Sara; GARRIDO, María J. Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 275, p. 162–176, abr. 2018.

MILLER, Christina R. *et al.* Liposome–Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 12875–12883, 1 set. 1998.

MOOIJ, Wijnand T. M.; VERDONK, Marcel L. General and targeted statistical potentials for protein–ligand interactions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 61, n. 2, p. 272–287, 16 nov. 2005.

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, 1998.

NONGKHLAW, Ridahunlang *et al.* Drug-loaded liposomes for macrophage targeting in Mycobacterium tuberculosis: development, characterization and macrophage infection study. **3 Biotech**, v. 15, n. 2, p. 52, 30 fev. 2025.

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

OBIEDALLAH, Manar M. *et al.* Optimization, characterization, and cytotoxicity studies of novel anti-tubercular agent-loaded liposomal vesicles. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.

OSHIRO, C. M.; KUNTZ, I. D.; DIXON, J. Scott. Flexible ligand docking using a genetic algorithm. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 9, n. 2, p. 113–130, abr. 1995.

PAGGI, Joseph M.; PANDIT, Ayush; DROR, Ron O. The Art and Science of Molecular Docking. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 93, p. 389–410, 2024.

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

PARIDA, Kishan Kumar *et al.* P-glycoprotein inhibitors as an adjunct therapy for TB. **Drug Discovery Today**, v. 29, n. 9, p. 104108, set. 2024.

PHETSUKSIRI, Benjawan *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 1999.

PINHEIRO, Marina *et al.* Liposomes as Drug Delivery Systems for The Treatment of TB. **Nanomedicine**, v. 6, n. 8, p. 1413–1428, 25 out. 2011.

REDDY, N. Subhakara *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, Yuri 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.

RODRIGUES, Domingos da Costa. **Aplicação de algoritmos genéticos: determinação de estruturas de clusters atômicos e liberação controlada de sistemas farmacêuticos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

ROJANARAT, Wipaporn *et al.* Inhaled pyrazinamide proliposome for targeting alveolar macrophages. **Drug Delivery**, v. 19, n. 7, p. 334–345, 18 out. 2012.

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

SERCOMBE, Lisa *et al.* Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 1 dez. 2015.

SERHAN, Charles N. Structure-based drug design. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 23–24, nov. 1996.

SHITIKOV, Egor A. *et al.* Unusual Large-Scale Chromosomal Rearrangements in *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 Cluster Isolates. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e84971, 8 jan. 2014.

SILVA-PEREIRA, Taiana Tainá; SOLER-CAMARGO, Naila Cristina; GUIMARÃES, Ana Marcia Sá. Diversification of gene content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex is determined by phylogenetic and ecological signatures. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 2, 6 fev. 2024.

SINGH, Bina Kumari *et al.* The C-terminal end of mycobacterial HadBC regulates AcpM interaction during the FAS-II pathway: a structural perspective. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 16, p. 4963–4980, 23 ago. 2022a.

- SINGH, Padam *et al.* NSC19723, a Thiacetazone-Like Benzaldehyde Thiosemicarbazone Improves the Efficacy of TB Drugs *In Vitro* and *In Vivo*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, 21 dez. 2022b.
- SINGH, Parul *et al.* Cell Envelope Lipids in the Pathophysiology of *Mycobacterium Tuberculosis*. **Future Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 689–710, 17 maio 2018.
- SINGH, Varshneya *et al.* Mycobacterium tuberculosis-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 5, p. 669–681, 15 nov. 2012.
- SINGH, Vinayak *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. 2022c.
- STEBELSKA, Katarzyna *et al.* Highly fusogenic cationic liposomes transiently permeabilize the plasma membrane of HeLa cells. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2007.
- STOCKERT, Juan C. *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785–796, dez. 2012.
- STOKES, Jonathan M. *et al.* A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. **Cell**, v. 180, n. 4, p. 688–702.e13, fev. 2020.
- TOH, Ming-Ren; CHIU, Gigi N. C. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 88–95, abr. 2013.
- TORCHILIN, V. P.; ZHOU, Fan; HUANG, Leaf. pH-Sensitive Liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 3, n. 2, p. 201–255, 28 jan. 1993.
- TORCHILIN, Vladimir P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145–160, fev. 2005.
- TOWNSLEY, M. I. *et al.* Pulmonary embolism: analysis of endothelial pore sizes in canine lung. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 255, n. 5, p. H1075–H1083, 1 nov. 1988.
- VEBER, Daniel 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, Marcel L. *et al.* Improved protein–ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, set. 2003.
- VIETH, Michal *et al.* . Assessing energy functions for flexible docking. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1612–1622, 1999.

VILJOEN, Albertus; DUFRÊNE, Yves F. Mechanobiology: How pathogens use mechanics to modulate host interactions. **Cell**, v. 186, n. 23, p. 4994–4995, 2023.

VYAS, S. P. *et al.* Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 37–49, jan. 2004.

WANG, Keran *et al.* **Recent advances from computer-aided drug design to artificial intelligence drug design**. **RSC Medicinal Chemistry** Royal Society of Chemistry, , 11 out. 2024.

WARNER, Digby F. *et al.* **Mycobacterium tuberculosis biology, pathogenicity and interaction with the host**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, , 2025.

WHO, World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240101531>>. Acesso em: 15 nov. 2025.

WHO, World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2025>>. Acesso em: 15 nov. 2025.

YOUN, Pilju; CHEN, Yizhe; FURGESSON, Darin Y. A Myristoylated Cell-Penetrating Peptide Bearing a Transferrin Receptor-Targeting Sequence for Neuro-Targeted siRNA Delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 486–495, 3 fev. 2014.

ZANGER, Ulrich M.; SCHWAB, Matthias. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103–141, abr. 2013.

ZHAO, Jing *et al.* Elucidating inhaled liposome surface charge on its interaction with biological barriers in the lung. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 172, p. 101–111, mar. 2022.