



ANÁLISE *in silico* E AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE DE FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE COMBINADO COM ANÁLOGOS DE CURCUMINA EM *Mycobacterium tuberculosis*

Giulienne Karla Pereira da Silva^{1*}, Renata Alexandre de Oliveira¹, Carolina Trevisolli Palomo¹, Jean Eduardo Meneguello¹, Juliano Hiroyuki Ito¹, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli¹, Regiane Bertin de Lima Scodro¹, Rosilene Fressatti Cardoso¹

¹Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, Brasil.

*giuliennekarlap@gmail.com

Área Temática: Doenças infecciosas e parasitárias

Resumo

A tuberculose (TB), doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), é uma das dez principais causas de mortes no mundo. A curcumina, presente na *Curcuma longa*, demonstra ter variadas bioatividades, entre elas atividade antimicobacteriana. No entanto, essa apresenta uma baixa biodisponibilidade oral, sendo pouco absorvida pelo intestino. Estudos com análogos estruturais, produzidos a partir de curcumina, foram realizados na tentativa de melhorar sua absorção bem como atividade anti-*M. tuberculosis*. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi realizar análise *in silico* com análogos de curcumina (dibenzalacetônico DB1, dibenzalacetônico DB2 e dibenzalacetônico DB3) e determinar a ação combinada com fármacos usados no tratamento da TB. Adicionalmente, ensaios *in vitro* para determinar sinergismo entre os fármacos anti-TB e derivados de curcumina foram realizados com cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA). Os estudos *in silico* demonstraram que os análogos de curcumina não violam nenhuma das propriedades Lipinski e possuem boas propriedades farmacocinéticas que lhes permite serem bem absorvidos pelo trato gastrointestinal ou, no caso do DB1 e DB2, atravessarem a barreira hematoencefálica, além de serem não mutagênicos e não tumorigênicos. Sobre os efeitos combinatórios, os análogos de interesse foram combinados com rifampicina, isoniazida e etambutol. O análogo DB3 se destacou quando combinado com a rifampicina, apresentando efeito sinérgico (FICI 0,373) e efeito modulador sobre esse fármaco (FM 8), diferente dos análogos DB1 e DB2 que mostraram ter atividades indiferentes quando combinados com os fármacos anti-TB. Portanto, os análogos de curcumina demonstraram potencial terapêutico *in silico* não violando nenhuma das propriedades Lipinski e, análogo DB3, foi capaz de modular a ação da rifampicina, tendo efeito sinérgico e modulador sobre esse fármaco.

Palavras-chave: Tuberculose Pulmonar; Compostos Orgânicos; Terapia combinada.

Introdução

A tuberculose (TB) tem sido reconhecida como um significativo problema de saúde pública, resultando em mais de um milhão de mortes por ano. A doença tem um caráter infectocontagioso, causado por bacilos do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, o qual acomete principalmente os pulmões. O tratamento da TB consiste em uma fase inicial intensiva de dois meses com isoniazida (IHN), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), seguida de quatro meses de manutenção com IHN e RIF. Entretanto, para que o tratamento seja eficaz, é

necessário ser realizado corretamente. O longo período do tratamento e efeitos colaterais ao paciente leva a uma alta desistência, e conseqüentemente a seleção de bacilos multirresistentes aos medicamentos usados no tratamento (WHO, 2023). A curcumina é um polifenol lipofílico extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa*. Em estudos anteriores, este composto já demonstrou ter variadas bioatividades (Dowdell, *et al.*, 2019), entretanto, apresenta algumas limitações, como baixa solubilidade em água, baixa estabilidade química e elevada instabilidade em condições fisiológicas, o que leva a baixa biodisponibilidade oral, além de possuir má absorção intestinal, o que faz que seja rapidamente excretada (Dowdell, *et al.*, 2019; Laudelino, *et al.*, 2020). Estudos demonstraram que a síntese de análogos de curcumina apresentou resultados promissores com atividade contra o bacilo *M. tuberculosis*, mostrando-se mais estáveis e potentes como antimicobacterianos (Laudelino, *et al.*, 2020). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi realizar análise *in silico* e *in vitro* da ação de análogos de curcumina combinados com fármacos anti-TB em *M. tuberculosis*.

Materiais e métodos

Foram estudados três análogos de curcumina: dibenzalacetônico DB1, dibenzalacetônico (DB2) e dibenzalacetônico (DB3), sintetizados no Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina. A análise *in silico* foi realizada com softwares SwisADME e Osiris Property Explorer para avaliar a absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) dos análogos. A partir de aspectos estruturais das moléculas, foram calculados os parâmetros ADMET de cada análogo. A cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá foi cultivada por 15 dias a 35°C em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase). A determinação da ação combinatória foi realizada com RIF, INH ou EMB com DB1, DB2 e DB3 pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA), conforme descrito por Caleffi-Ferracioli *et al.* (2013). Em microplacas de 96 orifícios foram diluídos seriadamente os análogos de curcumina (DB1 e DB3: 0,243 à 15,6 µg/mL; DB2: 0,061 à 3,9 µg/mL) no eixo X e os fármacos RIF (0,0025 a 0,64 µg/mL), INH (0,0037 a 0,96 µg/mL) ou EMB (0,0625 a 16 µg/mL) no eixo Y. Após, foram acrescentados 100 µL de suspensão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv previamente padronizada com a escala McFarland 1,0 e diluída 1:20, em cada orifício e incubadas por 7 dias a 35 °C. Após, foi acrescentado 30 µL de resazurina 0,01% em cada orifício e incubadas novamente nas mesmas condições por 24 horas. A presença de crescimento bacteriano foi determinada pela mudança da coloração azul para rósea, e a CIM foi determinada como a menor concentração do fármaco/análogo de curcumina capaz de inibir a mudança de cor da resazurina. A ação dos análogos de curcumina com os fármacos anti-TB foi determinada pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), onde $FICI = (MICA+B / MIC A / MIC B)$. Os valores de $FICI \leq 0,5$ foram considerados sinérgicos; $> 0,5 - 4$ indeterminados; e ≥ 4 antagônicos. Também, foi determinado o Fator Modulador (FM) de cada análogo de curcumina sobre os fármacos anti-TB, onde $FM = (MICA / MICA+B)$, sendo considerado significativo $FM \geq 4$ (Sampiron, *et al.*, 2019).

Resultados e discussão

Com base nos resultados obtidos com os softwares SwissADME (Tabela 1) foi possível efetuar diferentes análises *in silico* dos análogos de curcumina de interesse.

Todos os análogos de curcumina se enquadram dentro das propriedades de Lipinski (Tabela 1), sendo elas peso molecular ≤ 500 g/mol, ≤ 10 aceitadores de ligações de hidrogênio, ≤ 5 doadores de ligações de hidrogênio e $MLogP \leq 4,15$ (6), sugerindo que os análogos tem boa permeabilidade celular, bom balanceamento entre hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade, parâmetros esses importantes para a absorção oral. Possuem boa biodisponibilidade, além de maior aceitação de ligações de hidrogênio, o que pode influenciar na formação de ligações de hidrogênio com alvos biológicos. Quanto às propriedades farmacológicas (Tabela 1), DB1 e DB2 são análogos capazes de permear a barreira hematoencefálica. A área da superfície total (TPSA) dos derivados variaram de $35,53 \text{ \AA}^2$ a $103,11 \text{ \AA}^2$, o que os classifica dentro do adequado, entre 20 \AA^2 à 130 \AA^2 . Com os valores de TPSA foi possível calcular a percentagem de absorção pela fórmula $\%ABS = 109 - 0,345 \times TPSA$, os quais variaram entre 71,49% à 103,11%, indicando que todos os análogos tem potencial de absorção gastrointestinal pelo organismo (Sampiron, *et al.*, 2023). O software OSIRIS Property Explorer permitiu análises dos riscos de toxicidade (Tabela 2), que nos três análogos apresentaram um score moderado, entre 0.35 a 0.47, mas se mantiveram não mutagênico e não tumorigênico. DB1 demonstrou ser irritante e com potencial para causar efeitos adversos.

Tabela 1. Avaliação *in silico* da absorção, distribuição, metabolização excreção e toxicidade de análogos de curcumina.

Anál og os	Propriedades Lipinski				Propriedades farmacocinéticas			Riscos de toxicidade		
	MW (g/mol)	MLogP	HBA	HBD	BBB perm.	TPSA (\AA^2)	%ABS	Drug score	Irrit	E. rep
DB1	294.34	3.28	3	0	SIM	35.53	96,74	0.35	Sim	Sim
DB2	234.29	3.86	1	0	SIM	17.07	103,11	0.43	Não	Não
DB3	324.29	2.53	5	0	NÃO	108.71	71,49	0.47	Sim	Não

*DB1: Análogo dibenzalacetônico DB1; DB2: Análogo dibenzalacetônico DB2; DB3: Análogo dibenzalacetônico DB3; MW: Peso molecular; MLogP: Coeficiente de partição octanol-água; HBA: Aceitação de ligações de hidrogênio; HBD: Doação de ligações de hidrogênio; BBB perm.: Permeabilidade à barreira hematoencefálica; TPSA: Área de superfície total; %ABS: Percentagem de absorção; Irrit: Irritante; E. rep.: Efeito reprodutivo.

Tabela 2. Índice de concentração inibitória fracionária e fator modulador de análogos de curcumina associados com fármacos anti-tuberculose em *Mycobacterium tuberculosis*.

Análogos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	FICI			FM		
		RIF	INH	EMB	RIF	INH	EMB
DB1	1,95	1	2	2	1	1	1
DB2	0,244	2	2	2	1	1	1
DB3	1,95	0,373	2	1,5	8	2	2

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracionária; FM: Fator Modulador; RIF: Rifampicina; INH: Isoniazida; EMB: Etambutol.

Com bases nos estudos *in vitro* de ação combinatória com fármacos anti-TB, DB3 combinado com RIF apresentou FICI 0,373, que indica sinergismo de atividade (FICI \leq 0,5). Também foi determinado pelo FM que o DB3 tem potencial de diminuir a CIM da RIF em oito vezes contra *M. tuberculosis H₃₇Rv*. Os demais análogos demonstraram efeitos indiferentes na combinação com fármacos anti-TB (FICI 0,5 e 4 e FM 1).

Conclusões

Com base nas propriedades ADMET avaliadas *in silico*, ambos os compostos cumprem com as propriedades Lipinski, tendo um potencial de boa permeabilidade celular, balanceamento entre hidrofobicidade e lipofobicidade, biodisponibilidade. Todos derivados apresentaram boas propriedades farmacocinéticas, ressaltando DB1 e DB2 que além de serem bem absorvidos também permeiam a barreira hematoencefálica. Adicionalmente, com base nos estudos *in vitro*, DB3 mostrou modular a CIM de RIF e mesmo a combinação dos mesmos leva a sinergismo de ação anti-*M. tuberculosis*.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq – Código de Financiamento 001.

Referências

- CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 93, n. 6, p. 660–663, 2013.
- DOWDELL, K. *et al.* Nontuberculous mycobacteria in drinking water systems – the challenges of characterization and risk mitigation. **Current opinion in biotechnology**, v. 57, p. 127–136, 2019.
- LAUDELINO, J. S. *et al.* *Mycobacterium abscessus* urinary tract infection: case report. **Jornal brasileiro de nefrologia: órgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 42, n. 1, p. 124–126, 2020.
- ORGANIZATION, W. H. **Tuberculosis. 2023** Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/tuberculosis>>. Acesso em: 30 ago. 2024.
- SAMPIRON, E. G. *et al.* Hydrazone, benzohydrazones and isoniazid-acylhydrazones as potential antituberculosis agents. **Future microbiology**, v. 14, n. 11, p. 981–994, 2019.
- SAMPIRON, E. G. *et al.* Isoniazid-N-acylhydrazones as promising compounds for the anti-tuberculosis treatment. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 141, n. 102363, p. 102363, 2023.