

ANÁLISE *IN SILICO* E ATIVIDADE COMBINATÓRIA DE ANÁLOGOS DE CURCUMINA COM RIFAMPICINA CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Camille Marie Bampa Martins da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Juliano Hiroyuki Ito, Giulienne Karla Pereira da Silva, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientadora). E-mail: rfcardoso@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Ciências da Saúde, Microbiologia/ Microbiologia aplicada

Palavras-chave: Tuberculose; Curcumina; Sinergismo farmacológico.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. O tratamento atual é longo e enfrenta desafios com o surgimento de *M. tuberculosis* resistentes. A curcumina (CUR), um polifenol lipofílico extraído do rizoma da *Curcuma longa*, tem propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e sinérgicas com outros compostos, mas enfrenta limitações de biodisponibilidade e estabilidade o que demanda estudo no sentido de alterações da molécula para diminuir essas limitações. Desse modo, o presente projeto visou avaliar a atividade antimicobacteriana *in silico* de CUR e alguns análogos de CUR e sua combinação com rifampicina contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv. As características físico-químicas e farmacocinéticas dessas moléculas foram analisadas por diferentes softwares, enquanto a eficácia da associação com rifampicina foram determinadas pelos métodos *resazurin microtiter assay plate (REMA)* e *resazurin drug combination microtiter assay (REDCA)*. Foi evidenciado, pelos estudos *in silico*, que os análogos DB2 e DB3 são os melhores a atenderem aos critérios das Regras de Lipinski, com destaque para o análogo DB3, que apresentou características de grande relevância, como FICI= 0,373.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, com alta incidência e responsável por milhões de mortes em todo o mundo, causada pelo bacilo do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A curcumina é extraída de rizomas da *Curcuma longa* L., considerada alvo de interesse científico por apresentar potencial antibacteriano e antimicobacteriano entre outras atividades. Porém, apresenta baixa disponibilidade oral e instabilidade farmacológica, o que pode ser melhorado por realização de alterações em sua molécula como síntese de análogos de curcumina na tentativa de melhorar suas atividades farmacológicas. Estudos realizados *in silico* podem estimar a farmacocinética de moléculas em desenvolvimento, e dessa forma reduzir os procedimentos *in vitro* a serem realizados para prosseguimento da pesquisa de futuros fármacos. O presente projeto visou avaliar a atividade

antimicobacteriana *in silico* de CUR e alguns análogos de CUR e sua combinação com rifampicina contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

MATERIAIS E MÉTODOS

Determinação das características físico-químicas e farmacocinéticas in silico da curcumina e dos análogos de curcumina.

Nas análises *in silico* pelos softwares SwissADME e Osiris Property Explorer, foram determinadas características físico-químicas e farmacológicas da curcumina e seus nove análogos (DB1 – DB10). Foram avaliados critérios que auxiliaram a compreender a farmacocinética da curcumina e de seus análogos estudados. Essas propriedades denominadas pelas regras de Lipinski incluem peso molecular, coeficiente de partição octanol-água, número de aceptadores de hidrogênio e número de doadores de hidrogênio. Ademais, a passagem pela barreira hematoencefálica permanente, área superficial polar topológica e porcentagem de absorção foram propriedades farmacológicas também analisadas. Para finalizar, a toxicidade e seus riscos foram separados em índice de droga, irritante, mutagênico, tumorigênico e efeito reprodutivo.

Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) por resazurin microtiter assay plate (REMA) e Determinação da concentração inibitória fracionária (FICI) por resazurin drug combination microtiter assay (REDCA).

O estudo determinou a CIM da curcumina (CUR) e de nove análogos pelo método REMA. Para isso, suspensões de *M. tuberculosis* foram padronizadas por escala de McFarland nº1, inoculadas em microplacas contendo diluições seriadas (de acordo com o método descrito por Palomino et al. 2002) dos compostos e incubadas por 7 dias a 35 °C. Após esse período, adicionou-se solução de resazurina e as placas foram incubadas por mais 24h. A leitura foi feita de forma visual. A CIM foi definida como a menor concentração da CUR e nove análogos capaz de inibir a mudança de cor da resazurina. Para o método de REDCA, a suspensão de *M. tuberculosis* foi preparada, padronizada, diluída e adicionada em microplacas contendo os análogos e a CUR previamente diluídos. Os análogos testados foram diluídos de maneira seriada, de acordo com Caleffi-Ferracioli et al. (2013). As microplacas foram incubadas a 35 °C em atmosfera normal por 7 dias, e após esse período, adicionado uma solução de resazurina, e as microplacas incubadas a 35°C por 24h adicionais, com a leitura feita de forma visual. A ação da rifampicina combinada com CUR e seus análogos contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv foi determinada pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI), calculado como $FICI = (MICA+B / MICA) + (MICB+A / MICB)$. Além disso, foi também calculado o fator modulador (FM) = $(MICA / MICB)$, que foi considerado como significativos aqueles com $FM \geq 4$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados adquiridos foram interpretados segundo as regras de Lipinski e estão listados na **Tabela 1**. Foi evidenciado que os análogos DB2 e DB3 são os melhores a atenderem aos critérios das Regras de Lipinski, como perfil toxicológico baixo e boa absorção (%ABS acima de 70%). Outros análogos de CUR também apresentaram características favoráveis em outros parâmetros, entretanto, não se destacaram devido suas outras características desfavoráveis, como baixa porcentagem de absorção e irritantes. Todos os compostos foram avaliados *in vitro* por REMA e REDCA após a determinação da CIM e da atividade de suas associações com rifampicina (**Tabela 2**).

Tabela 1: Características físico-químicas e farmacológicas de curcumina e de análogos de curcumina determinadas com softwares SwissADME, Osiris Property e Marvin Live Demo.

Análogos	CUR	DB1	DB2	DB3	DB4	DB5	DB6	DB7	DB8	DB9
MW (g/mol)	368.38	294.34	234.29	324.29	286.13	326.16	341.17	394.18	302.16	386.26
MLogP	1.47	3.28	3.86	2.53	4.63	-	-	-	4.60	-
CLogP	2.95	3.78	3.92	2.08	5.24	6.15	5.10	4.56	5.53	8.00
WLogP	3.15	3.78	3.76	3.58	4.88	5.80	4.18	4.72	5.31	7.28
HBA	6	3	1	5	1	1	2	5	1	1
HBD	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BBB p	Não	Sim	Sim	Não	Sim	-	-	-	Sim	-
TPSA	93.06	35.53	17.07	108.71	17.07	17.07	20.31	53.99	17.07	17.07
%ABS	76.89	96.74	103.11	71.49	103.11	103.11	101.99	90.37	103.11	103.11
Índice de droga	0.44	0.35	0.43	0.47	0.21	0.18	0.39	0.35	0.34	0.24
Irritante	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Mutagênico	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Tumorigênico	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Efeito reprodutivo	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não

*CUR: curcumina; MW: peso molecular; MLogP, CLogP e WLogP: coeficiente de partição octanol-água; HBA: Número de aceptadores de hidrogênio; HBD: Número de doadores de hidrogênio; BBB p: barreira hematoencefálica permante; TPSA: área superficial polar topológica; %ABS: porcentagem de absorção.

Tabela 2: Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) por *resazurin microtiter assay plate (REMA)* e Determinação da FICI e FM por *resazurin drug combination microtiter assay (REDCA)*

Análogos de curcumina	CIM dos compostos (REMA)	FICI	FM
-----------------------	--------------------------	------	----

CUR	32	0,5	2
DB1	2	2	1
DB2	0,25	2	1
DB3	2	0,37 3	2
DB6	8	0,25	4
DB8	0,25	0,25	4
DB10	2	-	-
RIF	0,025		

O análogo DB3 se mostrou ser sinérgico com rifampicina (FICI= 0,373) e FM= 2. Além disso, possui CIM baixa (CIM=2), o que aumenta suas características favoráveis comparado aos outros análogos e a curcumina pura. Em relação à curcumina, a mesma apresenta bons parâmetros toxicológicos, como não irritante, não mutagênico, não tumorigênico e não possui efeito reprodutivo. Entretanto, ao comparar com os outros análogos, possui elevado índice de droga (0,44), baixa porcentagem de absorção, sendo menor que 70% (%ABS CUR= 76.89). Além disso, apresenta CIM elevada (CIM CUR= 32), sendo a segunda maior CIM dos compostos analisados, já que a maior CIM encontrada foi a do análogo DB8, de CIM= 64.

CONCLUSÕES

Portanto, com os resultados obtidos, os análogos de curcumina que se destacaram após a realização do presente estudo foram DB2 e DB3, com enfoque para o análogo DB3, que apresentou resultados vantajosos para futuros estudos, com CIM de pequeno valor, apresentando sinergismo com rifampicina, boa absorção e características toxicológicas adequadas. Ademais, enfatiza-se a necessidade dos análogos de curcumina ao observar os resultados obtidos com a curcumina pura, já que a mesma não possui características farmacológicas adequadas para sua eficácia e biodisponibilidade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

Palomino J, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. 2002. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother** 46: <https://doi.org/10.1128/aac.46.8.2720-2722.2002>