

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS (DITM) UFPB/UFRN/UFC/UFRPE

Ana Caroline Melo de Queiroz Oliveira

***Avaliação do potencial antimicobacteriano da Caulerpina e seus derivados
em modelos in silico e in vitro***

**João Pessoa
2023**

Ana Caroline Melo de Queiroz Oliveira

***Avaliação do potencial antimicobacteriano da Caulerpina e seus derivados
em modelos in silico e in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (DITM) UFPB/UFRN/UFC/UFRPE do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Desenvolvimento de Produtos e Processos Farmacêuticos

Orientadora: Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos - CCS-IPeFarM-UFPB

Co-orientador: Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior – Cbiotec -UFPB

João Pessoa-PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48a Oliveira, Ana Caroline Melo de Queiroz.
Avaliação do potencial antimicobacteriano da
Caulerpina e seus derivados em modelos in silico e in
vitro / Ana Caroline Melo de Queiroz Oliveira. - João
Pessoa, 2023.
118 f. : il.

Orientação: Bárbara Viviana de Oliveira Santos.
Coorientação: Valnês da Silva Rodrigues Junior.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

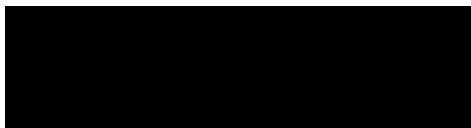
1. Atividade antimicobacteriana. 2. Caulerpa
racemosa. 3. Caulerpina. 4. Triagem virtual. I. Santos,
Bárbara Viviana de Oliveira. II. Rodrigues Junior,
Valnês da Silva. III. Título.

UFPB/BC CDU 615.281/.282(043)

ANA CAROLINE MELO DE QUEIROZ OLIVEIRA
Estudo da Caulerpina e seus derivados em modelos de *Mycobacterium tuberculosis* IN SÍLICO e IN VITRO

Tese aprovada em: 10/ 07/2023

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
Orientadora

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Examinador Interno

Profa. Dra. Maísa Freire Cartaxo Pires de Sá
Examinador Interno

Profa. Dra. Clélia de Alencar Xavier Mota
Examinador Externo



Prof. Dr. Josué do Amaral Ramalho
Examinador Externo

A minha família, em especial minha mãe, Paula, meu esposo, Augusto Clementino e filhos, Luis Augusto e Mariana, por todo apoio, carinho, compreensão e amor infinito.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que na sua infinita bondade, permitiu a realização deste sonho, concedendo-me coragem e perseverança necessárias para nunca desistir.

A Nossa Senhora, sempre fiel intercessora nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Luiz e Paula Queiroz, por todo apoio, carinho e cuidado com minha família.

Ao meu esposo Augusto Clementino de Oliveira, pelo apoio incondicional, aceitação e compreensão. Meu porto seguro e grande incentivador. Amor infinito...

A minha orientadora, Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos, por todo apoio concedido durante esta etapa tão importante na minha vida. Muito obrigada, Bárbara, por acreditar na minha capacidade e guiar meus passos para a conquista deste título.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior, por todo apoio e ensinamentos, fundamentais para a conclusão deste desafio.

Ao Prof. Dr Marcus Tullius Scotti e sua aluna Natália Ferreira, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgNSB), pelas contribuições, essenciais para conclusão da nossa pesquisa.

A querida Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, grande incentivadora do estudo e da pesquisa, referência de profissional e ser humano ímpar, tão presente em minha vida desde a graduação.

Aos membros da banca avaliadora, por aceitarem o convite e por todas as contribuições com o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire, pelas sínteses das moléculas.

Aos colegas Vinícius Antônio Barbosa Gonçalves, aluno PIBIC, e Fernando Ferreira Leite, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgNSB), por todo apoio, suporte e ajuda. Vocês foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

Aos colegas do DITM Zilka Nanes, Mayara Castro, Erik Melo e Fernanda Torres. Nossa amizade tornou o caminho mais leve e alegre. Muito obrigada, queridos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, DITM, em especial à Prof. Dra. Hilzeth

de Luna Freire Pessoa e ao Prof. Dr. Abrahão por todo apoio, suporte e ensinamentos transmitidos.

À secretária do DITM, Adriana Tiyoko Ura, por todo profissionalismo, competência e atenção.

Aos técnicos de laboratório Yuri Manguiera do Nascimento e Nonato, pela contribuição imprescindível para a conclusão deste trabalho.

A todos os funcionários que contribuíram para conclusão deste trabalho.

Enfim, a todos que colaboraram de alguma forma para a concretização desta etapa tão importante da minha vida.

Muito Obrigada!!!!

Ana Caroline Melo de Queiroz Oliveira.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”
(Filipenses, 4:13)

RESUMO

OLIVEIRA, Ana Caroline Melo de Queiroz Oliveira. **Estudo da Caulerpina e seus derivados em modelos de *Mycobacterium tuberculosis* IN SÍLICO e IN VITRO** (Doutorado Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (DITM) UFPB/UFRN/UFC/UFRPE, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2023.

A tuberculose humana (TB) é doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), bactéria patogênica e micro aerofílica, que afeta comumente os pulmões, sendo uma das enfermidades mais infecciosas do mundo. Devido ao surgimento de cepas bacterianas resistentes, a TB ainda é uma doença particularmente desafiadora, fato atribuído, principalmente, à baixa adesão aos protocolos de tratamento, mutações espontâneas no genoma destes microrganismos e efeitos colaterais dos fármacos. Dessa forma, esforços contínuos são necessários para descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos anti-TB. O ambiente marinho é uma fonte valiosa de diversos produtos naturais. A diversidade química das suas moléculas forneceu a descoberta de muitos produtos inovadores, dentre eles, a caulerpina, substância majoritária da espécie *Caulerpa racemosa*, um alcaloide bis-indólico, com comprovada atividade biológica antioxidante, antifúngica, antiespasmódica, antinociceptiva, antiinflamatória, antiviral e leishmanicida. De acordo com o potencial farmacológico dessa molécula, estudos foram realizados para o desenvolvimento de análogos pela introdução de novos substituintes, que resultaram em diferenças químicas significativas e diferentes propriedades farmacocinéticas. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar e avaliar o potencial antimicobacteriano da CLP e seus derivados em modelos de *Mtb*, através de estudos *in silico* e *in vitro*, como uma etapa inicial para o desenvolvimento de protótipos candidatos a fármacos para tratamento da TB. Logo, foram realizados estudos de modelagem molecular utilizando proteínas alvo de *Mtb* e como ligantes o alcalóide indólico CLP e seus análogos, com a construção de um modelo preditivo utilizando metodologias *in silico*, seguido do isolamento da CLP, síntese dos derivados com diferentes substituintes na função éster. Foram realizados testes *in vitro* para determinação da susceptibilidade de micobactérias aos compostos por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) daqueles com maior atividade em cultura de *Mtb* e avaliação *in silico* da biodisponibilidade oral e propriedades de absorção, distribuição, excreção e toxicidade (ADMET). O estudo do Docking molecular dos derivados sintéticos da CLP, das quatro proteínas analisadas (DpE1, Pantotenato sintetase, Enoil-ACP redutase e Diidrofolato redutase) demonstraram que os derivados sintéticos da CLP obtiveram energias negativas em todas as enzimas em estudo, revelando, dessa forma, que ocorreu interação com todos os alvos, destacando-se a CLP diisobutil, que demonstrou maior afinidade no alvo Pantotenato sintetase. Foi realizada a avaliação *in vitro* das moléculas mais promissoras, objetivando determinar a susceptibilidade de micobactérias aos compostos, constatando que o análogo CLP diisobutil apresentou os resultados mais promissores (=125 µM). Na avaliação *in silico* para determinação dos parâmetros teóricos da biodisponibilidade oral, sete análogos demonstraram promissoras

atividades farmacocinéticas e, com relação a avaliação da ADMET teóricos, a maioria demonstrou bons resultados.

PALAVRAS CHAVES: *Caulerpa racemosa*, Caulerpina, triagem virtual, atividade antimicobacteriana.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Ana Caroline Melo de Queiroz Oliveira. **Study of Caulerpine and its derivatives in models of Mycobacterium tuberculosis IN SYLIC and IN VITRO** (Doctoral Degree Program in Technological Development and Innovation in Drugs (DITM) UFPB/UFRN/UFC/UFRPE, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2023.

Human tuberculosis (TB) is an infectious disease caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), a pathogenic, micro-aerophilic bacterium that commonly affects the lungs and is one of the most infectious diseases in the world. Due to the emergence of resistant bacterial strains, TB is still a particularly challenging disease, a fact attributed mainly to poor adherence to treatment protocols, spontaneous mutations in the genome of these microorganisms, and drug side effects. Thus, continuous efforts are needed for the discovery and development of new anti-TB drugs. The marine environment is a valuable source of diverse natural products. The chemical diversity of its molecules has provided the discovery of many novel products, among them caulerpine, the major substance of the species *Caulerpa racemosa*, a bis-indolic alkaloid, with proven antioxidant, antifungal, antispasmodic, antinociceptive, anti-inflammatory, antiviral, and leishmanicidal biological activity. According to the pharmacological potential of this molecule, studies have been conducted to develop analogues by the introduction of new substituents, which resulted in significant chemical differences and different pharmacokinetic properties. The present work aimed to synthesize and evaluate the antimycobacterial potential of PLC and its derivatives in Mtb models, through in silico and in vitro studies, as an initial step towards the development of prototype drug candidates for TB treatment. Therefore, molecular modeling studies were performed using Mtb target proteins and as ligands the indolic alkaloid CLP and its analogues, with the construction of a predictive model using in silico methodologies, followed by the isolation of CLP, synthesis of derivatives with different substituents in the ester function. In vitro tests were performed to determine the susceptibility of mycobacteria to the compounds by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of those with higher activity in Mtb culture and in silico evaluation of oral bioavailability and absorption, distribution, excretion and toxicity (ADMET) properties. The molecular docking study of synthetic CLP derivatives of the four proteins analyzed (DpE1, Pantothenate synthetase, Enoil-ACP reductase and Dihydrofolate reductase) showed that the synthetic CLP derivatives obtained negative energies in all enzymes under study, thus revealing that interaction occurred with all targets, highlighting the diisobutyl CLP, which showed greater affinity in the Pantothenate synthetase target. The in vitro evaluation of the most promising molecules was carried out, aiming to determine the susceptibility of mycobacteria to the compounds, finding that the diisobutyl CLP analog showed the most promising results ($\approx 125 \mu\text{M}$). In the in silico evaluation for determination of theoretical oral bioavailability parameters, seven analogues showed promising pharmacokinetic activities and, with regard to the evaluation of theoretical ADMET, most showed good results.

KEY WORDS: *Caulerpa racemosa*, Caulerpine, virtual screening, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>Mtb</i>)	26
Figura 2:	Corte esquemático do envelope celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>Mtb</i>)	27
Figura 3:	Estrutura da <i>Caulerpa racemosa</i> (Forssk.) J. Agardh	32
Figura 4:	Substâncias marinhas isoladas da <i>Caulerpa racemosa</i> (Forssk.) J. Agardh	36
Figura 5:	Proposta de fluxo de trabalho que foi utilizada para a triagem virtual, isolamento, identificação e atividades <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> da CLP e derivados.	42
Figura 6:	Derivados da Caulerpina com diferentes substituintes na porção éster	43
Figura 7:	Curva Receiver operating characteristic (ROC) gerada para o modelo Random Forest (RF) com os descritores Dragon 7. Legenda: (A) Teste e (B) Cross Validation	57
Figura 8:	Figura 8: Interações 2D e 3D entre o composto Caulerpina diisobutil (A), o Moxifloxacino (B), a Rifampicina (C), o ligante PDB 2-(4-(ciclohexilmetil) piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-benzo[e][1,3]tiazin-4-ona e a macromolécula Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR) (D). Interações: interações hidrofóbicas estão destacadas em rosa, as interações de hidrogênio estão destacadas em verde e as interações estéricas estão destacadas em laranja e em vermelho. Resíduos: Lys (Lisina), Val (Valina), Gly (Glicina), Tyr (Tirosina), Cys (Cisteína), Asn (Asparagina), His (Histidina), Leu (Leucina), Trp (Triptofano), Ser (Serina)	64
Figura 9:	Interações 2D e 3D entre o composto Caulerpina diisobutil (A), o Moxifloxacino (B), a Rifampicina (C), o ligante PDB ácido [5-metoxi-2-([4-(trifluorometil)fenil]sulfonil)carbamoil]-1H-indol-1-il]acético (D) e a macromolécula Pantotenato sintetase (PDB: 4MUE). Interações: interações hidrofóbicas estão destacadas em rosa, as interações de hidrogênio estão destacadas em verde e as interações estéricas estão destacadas em laranja e em vermelho. Resíduos: Met (Metionina), Val (Valina), Asp (Ácido aspártico), Gly (Glicina), Phe (Fenilalanina), Leu (Leucina), His (Histidina), Ser (Serina), Lys (Lisina), Pro (Prolina), Thr (Treonina), Glu (Ácido glutâmico), Gln (Glutamina) e Ala (Alanina)	68
Figura 10:	Estrutura do alcaloide bis-indólico, Caulerpina	69
Figura 11:	Estrutura química dos derivados da Caulerpina	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo	50
Tabela 2:	Resumo dos parâmetros correspondentes aos resultados obtidos para o modelo elaborado com os descritores Dragon 7	56
Tabela 3:	Probabilidade de atividade dos derivados sintéticos ésteres da Caulerpina contra o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> avaliados pelo algoritmo Random Forest (RF)	58
Tabela 4:	Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo	59
Tabela 5:	Valores de energia de ligação dos compostos derivados sintéticos da Caulerpina analisados nas quatro proteínas selecionadas no estudo. Os melhores resultados estão destacados em negrito e na cor vermelha	60
Tabela 6:	Dados comparativos de RMN ¹ H e ¹³ C da Caulerpina (1) (δ, CDCl ₃ , 200 MHz) com dados da literatura (δ, CDCl ₃ , 150 MHz)	70
Tabela 7:	Análise <i>in silico</i> da biodisponibilidade oral de acordo com a regra dos 5 Lipinski	73
Tabela 8:	Propriedades de classificação de ADMET, calculadas no software admetSAR	77
Tabela 9:	Propriedades de regressão ADMET, calculadas no software admetSAR	80
Tabela 10:	Valores da CIM para a CLP e seus derivados contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	86
Tabela 11:	Valores da CIM para a CLP e seus derivados contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Asn	Asparagina
Asp	Aspartato/ ácido aspártico
BDQ	Bedaquilina
BDQ	Bedaquilina
Caco-2	Células do adenocarcinoma do cólon humano
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CLP	Caulerpina
CY	Citocromo
Cys	Cisteína
DHFR	Diidrofolato redutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DprE	Decaprenilfosforil- β -D-ribose-2'-epimerase
DprE1	Decaprenilfosforilbeta D ribose oxidase
E	Etambutol
EC₅₀	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
EMA	European Medicines Agency
EMA	European Medicines Agency
ENR	Enoil ACP redutase
FASs	Ácidos graxos sintases
FDA	Food and Drug Administration
Gln	Glutamina/ Glutamida
Glu	Glutamato/ Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HERG	Gene relacionado com o éter-a-go-go humano
His	Histidina
HSV-1	Vírus do herpes simples humano
IC₅₀	Concentração inibitória
IZO	Isoniazida
LBDD	Desenho de fármacos baseado em ligantes
Leu	Leucina

Lys	Lisina
LZD	Linezolida
MbtA	Enzima adeniladora de ácido arílico
MDR TB	Tuberculose resistente a múltiplos fármacos
MDV	Molegro Virtual Docker
Met	Metionina
MetHb	Metahemoglobina
MIC	Concentração inibitória mínima
MilLogp	Coeficiente de partição octanol água
MmpL	Proteína de membrana micobacteriana
MmpL3	Transportador de ácido micólico
MOX	Moxifloxacina
MptpB	Proteína tirosina fosfatase
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MW	Peso molecular
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
Natom	Número de átomos
nOHNH	Número de doadores de hidrogênio
nON	Número de aceptores de hidrogênio
nROTB	Número de rotações
nV	Número de violações
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PDB	Protein Data Bank
P-gp	Glicoproteína P
PH	Fenilhidrazina
Phe	Fenilalanina
PMD	Pretomanida
Pro	Prolina
QcrB	Subunidade b do complexo respiratório do citocromo bc1
QSAR	Métodos de relação de atividade de estrutura
RIF	Rifampicina
REMA	Redução rezazurina em microplaca
RMN	Ressonância magnética nuclear

RMSD	Desvio quadrático médio
RMSDs	Desvios da raiz quadrada média
SBDD	Desenho de fármacos baseado em ligantes
Ser	Serina
SITE-TB	Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose
TB Alliance	Aliança global para o desenvolvimento de fármacos
TB	Tuberculose
Thr	Treonina
TPSA	Área de superfície polar total
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Vol	Volume
WHO	World Health Organization ou Organização Mundial de saúde
WHO	Word Health Organization
XDR TB	Tuberculose extensivamente resistente a fármacos
Z	Pirazinamida

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1	Tuberculose e a espécie <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
2.2	Alvos de fármacos na terapia da tuberculose	27
2.2.1	Alvos envolvidos com os componentes da parede celular	28
2.2.1.1	Enzima enoil-ACP redutase	28
2.2.1.2	Decaprenilfosforilbeta-D-ribose oxidase (DprE1)	29
2.2.1.3	Proteína tirosina fosfatase B (MtpB)	30
2.2.1.4	Pantonato sintetase	30
2.2.2	Outro alvo	30
2.2.2.1	Diidrofolato redutase (DHFR)	30
2.3	Produtos naturais: Fonte de novos fármacos	30
2.4	Estudo <i>in silico</i>	33
2.5	Versatilidade biológica do núcleo Indólico	34
2.5.1	Indóis	34
2.5.2	Caulerpina (CLP)	35
3.	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4.	METODOLOGIA	41
4.1	TRIAGEM VIRTUAL	41
4.1.1	Seleção dos compostos e dados de atividade biológica	41
4.1.2	Modelo de Predição	44
4.1.3	Banco de Dados do Modelo e curagem de dados	44
4.1.4	Descritores Moleculares	45
4.1.5	Modelo de Predição e Validação Estatística	45
4.1.6	Identificação dos resíduos que fazem contato com os ligantes	47
4.1.7	Região do sítio ativo utilizado	47
4.1.8	Obtenção e preparo dos ligantes	47
4.1.9	Análise das simulações por Dinâmica Molecular / Cálculo de acoplamento molecular e visualização das interações	48
4.1.10	Docagem Molecular	49
4.2	ESTUDO FITOQUÍMICO - OBTENÇÃO DAS MOLÉCULAS	51

4.2.1	Coleta do material	51
4.2.2	Preparação do extrato metanólico	51
4.2.3	Isolamento da Caulerpina (6E, 13E)-dimetil 5,12- dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)	51
4.2.4	Derivados da Caulerpina para os estudos <i>in vitro</i>	52
4.3	METODOLOGIA UTILIZADA PARA PREVISÃO DE PROPRIEDADES DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE	52
4.3.1	Avaliação da biodisponibilidade oral <i>in silico</i>	53
4.3.2	Teste toxicológico <i>in silico</i>	53
4.4	ESTUDOS <i>in vitro</i>	53
4.4.1	Ensaio de suscetibilidade a micobactérias	53
4.4.1.1	Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1	TRIAGEM VIRTUAL	56
5.1.1	Modelo de Predição	56
5.1.2	Estudo de <i>Docking molecular</i>	58
5.1.3	Avaliação da interação molecular entre o composto Caulerpina isobutil, os inibidores Moxifloxacino e Rifampicina, o ligante PDB (2-(4-(ciclohexilmetil) piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-benzo[e][1,3]tiazin-4-ona) e a macromolécula Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR)	61
5.1.4	Avaliação da interação molecular entre o composto Caulerpina isobutil, os inibidores Moxifloxacino e Rifampicina, o ligante PDB ácido [5-metoxi-2-({[4-(trifluorometil)fenil]sulfonil}carbamoil)-1H-indol-1-il]acético e a macromolécula Pantotenato sintase (PDB: 4MUE)	65
5.2	ESTUDO FITOQUÍMICO	69
5.2.1	Identificação estrutural da Caulerpina	69
5.3	AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL <i>in silico</i> : MOLINSPIRATION	71
5.4	AdmetSAR	76
5.5	RESULTADOS DOS ESTUDOS <i>in vitro</i>	85
5.5.1	Determinação das MIC da Caulerpina e análogos em cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	85
6.	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	92

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose humana (TB), doença infecto-contagiosa, é causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ou bacilo de Koch, bactéria patogênica micro aerofílica, que estabelece comumente sua infecção nos pulmões. Devido a sua contínua disseminação, agressiva evolução, possibilidade de recidiva e reinfeção endógena, tal patologia tem preocupado as autoridades da área de saúde (PROCÓPIO, 2008).

A TB, antes da pandemia da COVID-19, era um dos principais problemas de saúde pública, chegando a ocupar a principal causa de morte por doenças infecciosas, chegando a ultrapassar, em 2015, a infecção pelo HIV (SILVA et al., 2021). A pandemia de COVID-19 teve um impacto significativo nas notificações, no diagnóstico e tratamento da TB. Um estudo recente da Global Tuberculosis Network, indicou que as notificações de diagnóstico de TB (ativa e latente) diminuíram durante a pandemia em muitos países, e isso poderá gerar sérias consequências para a incidência e a mortalidade por TB no futuro (MIGLIORI et al., 2021). Essas subnotificações foram justificadas devido à emergência da pandemia de COVID-19, culminado na reorganização de ações, serviços e sistemas de saúde em todo o mundo, o que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), reverteu anos de progresso no controle da TB (WHO, 2021).

Recentemente, no relatório Global da Tuberculose da Organização Mundial da Saúde de 2022 (OMS), observou-se que cerca de 10,6 milhões de pessoas foram contaminadas em 2022, com o aumento de 4,5% em relação a 2020. A OMS ainda relatou que, em 2021, aproximadamente 1,6 milhões de pessoas morreram em todo mundo por causa desta enfermidade (Organização Pan-Americana da Saúde, 2022). Esses dados demonstraram que, apesar de a TB ser vista como uma doença do passado, ela continua sendo uma das mais infecciosas do mundo, com lacunas importantes na cobertura, bem como nas deficiências graves quando se trata de diagnóstico e tratamento dessa doença.

Diante desse panorama da TB, é de fundamental importância lutar por mais investimentos em pesquisas, prevenção, triagem e acesso ao diagnóstico e tratamento, inclusive com o aumento e volta da cobertura da estratégia dos programas de Saúde da Família aqui no Brasil, que desenvolvam ações de busca ativa, controle e tratamento da doença, aliados a melhorias na rede laboratorial e a

implantação de métodos de diagnósticos rápidos, gerando dessa forma, um retorno favorável em relação aos dados epidemiológicos.

Outro fator importante está relacionado ao tratamento farmacológico da TB, que vêm apresentando resultados insatisfatórios, principalmente, devido ao surgimento de cepas bacterianas resistentes. Aqui no Brasil, o tratamento padrão preconizado pelo Ministério da Saúde, com duração de 6 meses, é composto por quatro fármacos na fase intensiva e dois na fase de manutenção, ou seja, consiste na associação de medicamentos (poliquimioterapia), objetivando evitar a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistências aos fármacos. Os principais utilizados no esquema terapêutico são rifampicina (R), isoniazida (H ou INH), pirazinamida (Z) e etambutol (E) (BRASIL, 2022d). O tratamento da TB suscetível a medicamentos envolve uma fase inicial desses fármacos durante dois primeiros meses, seguido por uma fase de continuação de rifamicina e isoniazida nos últimos quatro (BRASIL, 2019).

A isoniazida inibe a síntese de ácidos micólicos, um componente importante da parede de micobactérias, não atuando contra outros tipos de bactérias (WINDER, F.G. & COLLINS, 1970). A rifampicina bloqueia a transcrição, inibindo a síntese de RNA, mais especificamente a RNA-polimerase-DNA-dependente (DDRP) da bactéria sensível, cessando a síntese de proteínas da célula bacteriana (WALSH, 2003; BRÖTZ-OESTERHELT; BRUNNER, 2008).

A pirazinamida apresenta ação bactericida sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Age somente em meio ácido e contribui para eliminar bacilos presentes dentro de macrófagos (ZHANG & MITCHISON, 2003). Com relação ao etambutol, sua substância ativa age contra o microorganismo causador da TB, interrompendo a sua multiplicação e diminuindo os sinais e sintomas da doença em algumas semanas, através da inibição da biossíntese de arabinogalactano (ZHANG et al., 2003). A TB é uma doença particularmente desafiadora e com rápido desenvolvimento de cepas resistentes, fato atribuído, principalmente, à baixa adesão aos protocolos de tratamento (FERNANDES, 2021).

Apesar desse sistema de poliquimioterapia utilizada, ainda continua, cada vez mais frequente, o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, que acabam desenvolvendo-se através de eventos aleatórios nas micobactérias - mutações espontâneas no genoma destes microrganismos. Além disso, há também as limitações que contribuem para sua baixa adesão, como longa duração e diversos

efeitos colaterais dos fármacos (LIMA et al, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

A TB multirresistente a medicamentos (MDR-TB) é causada por bacilos resistentes, pelo menos, a isoniazida e rifampicina, enquanto a TB extensivamente resistente (XDR-TB) é causada por cepas resistentes a isoniazida e rifampicina, além de qualquer fluoroquinolona e pelo menos um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha (FERRARIS et al., 2018; RODE et al., 2019).

Com o intuito de melhorar a adesão do paciente, como também diminuir a MDR-TB e a XDR-TB, outros fármacos foram desenvolvidos para melhor controle da TB, dentre eles a bedaquilina (BDQ) (Sirturo®; Janssen Therapeutics), uma diarilquinolina aprovada pela primeira vez em 2012 pelo FDA para o tratamento da MDR-TB, tendo como alvo o metabolismo energético das micobactérias replicantes e não replicantes. Especificamente, a BDQ inibe a enzima ATP sintase, que converte ADP em ATP (KOUL et al., 2007), enzima essencial para a geração de energia no *Mycobacterium tuberculosis* (GINSBERG, 2010; APPETECCHIA et al., 2020).

Outro fármaco descoberto foi a delamanida (Deltyba®; Otsuka Pharmaceutical), que foi aprovada em 2014 pelas agências regulatórias europeias e japonesas, European Medicines Agency (EMA) e Japanese Regulatory Authority, respectivamente. Seus metabólitos matam o *Mycobacterium tuberculosis* pelo bloqueio da síntese dos ácidos micólicos e da respiração (MENG et al., 2015; RUSTOMJEE, ZUMLA, 2015)

A pretomanida (PMD) (TB ALLIANCE) foi aprovada em 2019 pelo FDA, e em combinação com BDQ e linezolida (LZD), e foi indicada para o tratamento de formas altamente resistentes aos fármacos de TB pulmonar (MDR-TB ou XDR-TB intolerante ao tratamento / não responsivo) (NAHID et al., 2019). A PMD inibe a biossíntese de proteínas e lipídeos em bactérias replicantes, prejudicando a síntese de ácidos micólicos da camada bilipídica da parede celular. Em bactérias não replicantes atua pela liberação de espécies reativas do nitrogênio (TB ALLIANCE, 2019).

Delamanida e PMD são representantes da classe dos nitroimidazóis e ambos atuam por meio da inibição da biossíntese de ácidos micólicos. Os metabólitos da Delamanida matam o *Mycobacterium tuberculosis* pelo bloqueio da síntese dos ácidos micólicos e da respiração (MENG et al., 2015; RUSTOMJEE, ZUMLA, 2015). São pró-fármacos que requerem ativação metabólica por uma enzima nitroredutase

dependente de deazaflavina e presente no *Mycobacterium tuberculosis* (MATSUMOTO et al., 2006; MANJUNATHA; BOSHOF; BARRY, 2009a).

Apesar dessas novas alternativas farmacológicas apresentarem eficácia para tratamento da TB, a alta capacidade de adaptação, como também o desenvolvimento de mutações associadas à resistência bacteriana, destacam a importância de esforços contínuos para descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos anti-TB (BLOEMBERG et al., 2015).

Atualmente, após aproximadamente uma década da inatividade na descoberta de novos fármacos para TB, existe a necessidade urgente de uma abordagem coordenada envolvendo redes multidisciplinares de pesquisadores, bem como parcerias entre a indústria e o setor público em países desenvolvidos e em desenvolvimento, para a descoberta de novos medicamentos. Depois da descoberta da bedaquilina, houve um aumento considerável do interesse em substâncias com potente atividade antituberculose. Diversos núcleos heterocíclicos e subunidades estruturais já foram relatados como grupamentos farmacofóricos com potente atividade antimicobacteriana, dentre eles os derivados fluxânicos, nitroimidazólicos, ftalimídicos, cumarínicos, tiofênicos, fluoroquinolônicos, quinolônicos, *N*-acilhidrazônicos, quinoxalínicos e fluorados (FERNANDES, 2021).

Entre os métodos de descoberta de novos fármacos para TB, a modificação molecular mostrou-se como uma das mais promissoras estratégias (WERMUTH, 2008; KOUL et al., 2011; SANTOS et al., 2014). Esta consiste em alterações químicas na estrutura de um protótipo ou um fármaco, visando melhorar as propriedades biofarmacêuticas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, obtendo assim, moléculas com maior eficácia e segurança para utilização na terapia medicamentosa. Essa estratégia vem sendo utilizada pela Química Medicinal por muitos anos, permitindo a descoberta de diversos fármacos disponíveis na atualidade (KOUL et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

Na busca incessante por novos modelos estruturais para tratamento da TB, Canché Chay et al. (2014) testaram um produto natural isolado de algas marinhas, a caulerpina (CLP), um alcaloide bisindólico extraído da alga *Caulerpa racemosa*, e seus análogos, frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. Seis novos análogos foram sintetizados a partir dos indóis em quatro etapas com rendimentos globais entre 3% e 8%. Todos os compostos sintetizados foram avaliados contra a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, e a substância classificada como 1A (Dimethyl

5,12-Dihydrocycloocta[1,2-b:5,6-b']-diindole-6,13-dicarboxylate) exibiu excelente atividade (IC_{50} 0,24 μ M).

Dessa forma, seguindo os resultados publicados por Canché Chay et al. (2014) com a CLP e análogos contra *M. tuberculosis*, sugerindo que o núcleo indólico poderia fazer parte do arranjo estrutural responsável pela atividade contra micobactérias, considerou-se, nesta pesquisa, a importância da investigação dos efeitos de substituintes posicionados na porção éster da molécula da CLP em um modelo *in vitro* de susceptibilidade de micobactérias a candidatos a fármacos.

Inicialmente foram utilizadas avaliações virtuais da CLP e seus análogos em modelos/alvos enzimáticos de *M. tuberculosis* com o objetivo de identificar quais seriam as mais potentes. Seguindo os resultados dos testes virtuais das possíveis moléculas mais promissoras, foram utilizados modelos *in vitro* com cepas de *M. tuberculosis* em três ensaios independentes com a CLP e seus análogos (ácido caulerpínico, caulerpina diisobutil, caulerpina dipentil, caulerpina dietil, caulerpina dipropil).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

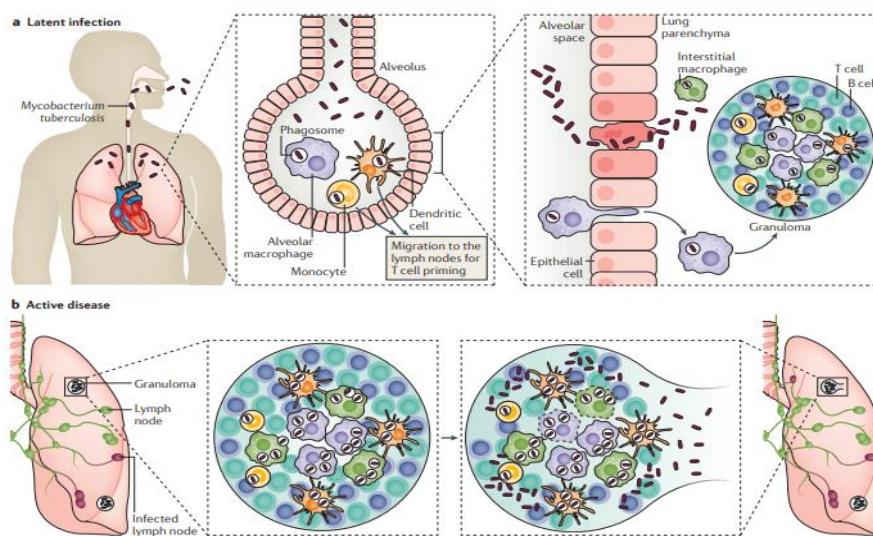
2.1 Tuberculose e a espécie *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por micobactérias do gênero *Mycobacterium*, sendo a espécie responsável pelo maior número de casos de morbidade e mortalidade, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

A micobactéria afeta os pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar outros órgãos, como ossos, sistema nervoso central, sistema urinário e reprodutor (TB extrapulmonar). A doença é transmitida pelo ar no momento em que pessoas infectadas com TB pulmonar na forma ativa, expõem as partículas contendo as micobactérias, principalmente através da tosse (Figura 1) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014)

O gênero *Mycobacterium* é composto por mais de 100 espécies, sendo algumas patogênicas e a grande maioria não patogênicas. As espécies patogênicas compõem o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), classificado como álcool-ácido-resistente e Gram positivo, e o reservatório natural do *Mtb* é o ser humano (PALOMINO; LEAO; RITACCO, 2007; FORRELLAD et al., 2013)

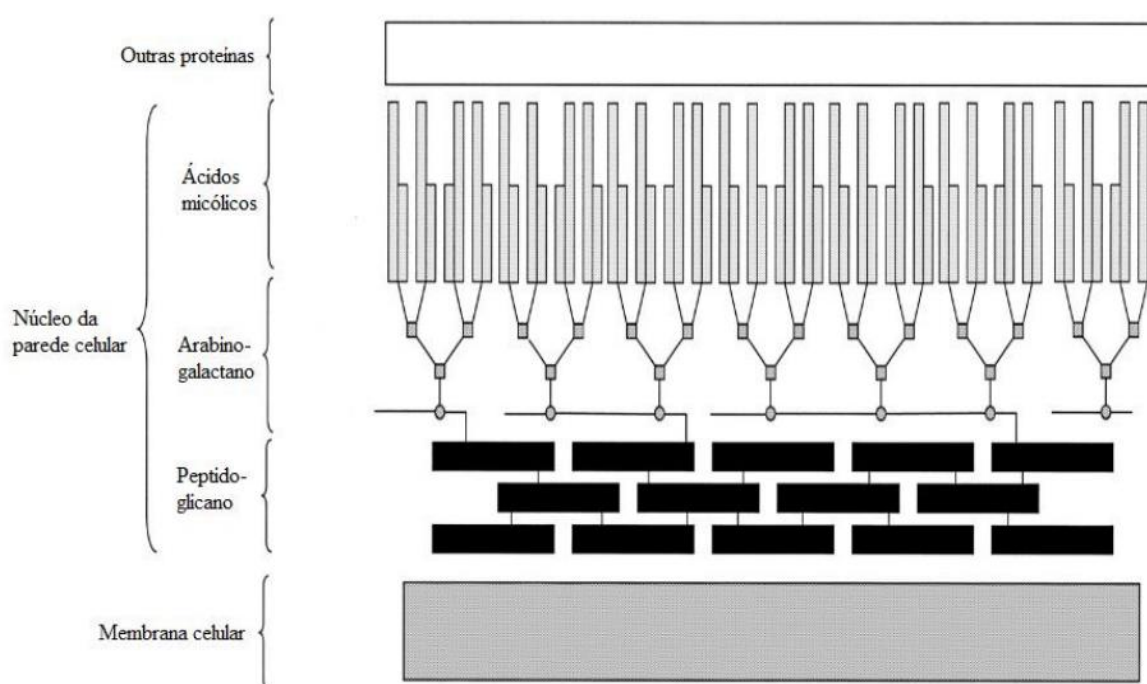
Figura 1: infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)



Fonte: <https://www.nature.com/articles/nrdp201676>

A estrutura das micobactérias é formada por sua parede celular, que protege o conteúdo intracelular, proporciona suporte mecânico, e é responsável pela forma característica do bacilo. Essa parede se destaca por ser um dos fatores mais importantes de virulência e resistência (FORRELLAD et al., 2013), sendo constituída por três classes de biomacromoléculas ligadas covalentemente (ácidos micólicos, arabinogalactanos e peptidoglicanos), que formam uma camada espessa, impedindo a passagem da maioria dos agentes antibacterianos (Figura 2) (FORRELLAD et al., 2013; JACKSON, MCNEIL, BRENNAN, 2013; BRENNAN; NIKAIIDO, 1995; DUCATI et al., 2006)

Figura 2: corte esquemático do envelope celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)



Fonte: Crick et al. (2001)

2.2 Alvos de fármacos na terapia da TB

Durante muito tempo, o principal alvo molecular na terapia antituberculose residiu nos componentes da parede celular biossintetizados pelas bactérias; no entanto, nos últimos anos, avanços vêm sendo realizados visando a identificação de novos alvos capazes de interferir em diferentes vias metabólicas/bioquímicas essenciais à sobrevivência da micobactéria. Diversos alvos potenciais já foram

identificados no Mtb usando a combinação dessas estratégias, como por exemplo, DNA girasse, (subunidade B) e topoisomerase I, MbtA (enzima adeniladora de ácido arílico), QcrB (Subunidade b do complexo respiratório do citocromo bc1), NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) desidrogenase II, DprE (Decaprenilfosforilbeta-D-ribose oxidase) FASs (Ácidos graxos sintases) e MmpL (Proteína de membrana micobacteriana) (FERNANDES et al., 2015; LAMICHHANE, 2011).

2.2.1 Alvos envolvidos com os componentes da parede celular

Os ácidos micólicos, que desempenham função determinante na hidrofobicidade da parede celular, são provenientes da biossíntese de ácidos graxos, da qual participam complexos multi-enzimáticos, denominados em conjunto como ácido graxo sintase (*fatty acid synthase*, FAS), envolvendo ciclos repetidos de reações de condensação, ceto-redução, desidratação e enoil-redução (HEATH; WHITE; ROCK, 2002). As micobactérias possuem dois tipos de FAS: FAS-I, responsável pela síntese de ácidos graxos contendo 16-26 átomos de carbono, e FAS-II, responsável pela extensão da cadeia dos ácidos graxos produzidos pela FAS-I em até 56 átomos de carbono, originando os precursores dos ácidos micólicos (CANTALOUBE et al., 2011; DE SOUZA et al., 2008a; SLAMA et al., 2011).

2.2.1.1 Enzima enoil-ACP redutase:

As enzimas envolvidas na via FAS são alvos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos, dentre elas, a mais conhecida é a enoil-ACP redutase (ENR), denominada InhA no caso da ENR do Mtb. As enoil-ACP redutases são enzimas cruciais à etapa de alongamento de ácidos graxos, considerados produtos intermediários na biossíntese de ácidos micólicos - os principais componentes da parede celular micobacteriana. Portanto, tais enzimas são consideradas como alvos moleculares no planejamento racional de novos tuberculostáticos (PASQUALOTO et al., 2004).

Essa enzima, inibida pela isoniazida (um importante fármaco utilizado no combate à TB descoberto em 1952), é ativa em bacilos sensíveis, perdendo sua atividade em cepas resistentes, devido a mutações na enzima catalase-peroxidase micobacteriana (KatG), necessária para a ativação desse fármaco, caracterizando-o como um pró-fármaco (ZHANG et al., 1992).

A enzima InhA é codificada pelo gene *InhA* e possui 268 aminoácidos com massa molecular de ~29 kD. Pertence à família de enzimas desidrogenase/reductase de cadeia curta, as SDR (short chain dehydrogenase/reductase), que utilizam como coenzima uma molécula de NAD(H) ou NADP(H) (PARIKH et al., 2000). Essa família de proteínas é caracterizada por apresentar uma topologia onde cada subunidade consiste em um domínio único com o núcleo central do tipo Rossmann fold, onde se encontra o sítio de ligação da coenzima (ROSSMANN et al., 1975). De forma geral, a estrutura da enzima se parece com uma cadeira e é composta por sete fitas β e oito hélices α . A coenzima se liga em uma cavidade entre o “encosto” e o “assento” da estrutura. O sítio de ligação do substrato localiza-se em uma cavidade no “encosto” (DESSEN et al., 1995).

O sítio ativo da InhA: os aminoácidos que delimitam o lado mais externo (em relação ao tetrâmero) da cavidade de ligação, formam duas hélices α transversais sustentadas por alças e são chamados de “alça de ligação ao substrato” (resíduos 196-219) (DESSEN, et al., 1995). A alça de ligação ao substrato é um motivo estrutural da InhA e é maior nesta enzima do que nas demais enoil redutases (ENRs), o que está de acordo com a especificidade da ENR de *Mtb* de reduzir substratos maiores (ROZWARSKI et al., 1999). Os aminoácidos do lado oposto formam duas grandes alças igualmente importantes para a ligação do substrato no sítio ativo (alças A e B). Estas encontram-se do lado da enzima que faz contato com as demais subunidades do homotetrâmero, enquanto as duas hélices da alça de ligação ao substrato estão voltadas para fora do tetrâmero, em direção ao solvente.

2.2.1.2 Decaprenilfosforil-beta-D-ribose oxidase (DprE1):

Alvo essencial como também vulnerável, envolvido na síntese da parede celular bacteriana. Está localizada no espaço periplasmático. É uma enzima heterodimérica formada por duas proteínas: DprE1 e DprE2 que são responsáveis para biossíntese do decaprenilfosforil- β -D-arabinofuranose (DPA), um dos precursores do arabinano – responsável para a formação da parede celular da micobactéria.

A maioria dos fármacos inibidores de DprE apresenta um grupo nitro em sua estrutura o qual contribuiu para a formação de uma ligação covalente com um resíduo de cisteína (Cys387) no sítio ativo da DprE1 levando a formação de um aduto (RICCARDI, et al., 2013). Foi demonstrado que um conjugado triazol-di-

indolilmetano foi ativo contra esta enzima com $IC_{50} = 1,52 \mu\text{g/mL}$ contra a cepa H37Ra de Mtb (REDDY & PAL. 2020)

2.2.1.3 Proteína tirosina fosfatase B (MptpB):

Esta enzima é considerada um alvo interessante em razão da sua localização externa à parede celular e está associada à modulação da interação patógeno-hospedeiro. Dos derivados indólicos que se mostraram ativos contra Mtb, um composto contendo grupo carbonila na posição C-3 do anel indólico demonstrou 81% de inibição (com $1 \mu\text{M}$) da enzima MptpB com $IC_{50} = 0,079$ (REDDY & PAL. 2020).

2.2.1.4 Pantionato sintetase:

A macromolécula pantotenato sintase (PDB: 4MUE), representa uma enzima vital para a estrutura do *Mycobacterium tuberculosis*. Sua ação caracteriza-se por catalisar a formação dependente de ATP de uma ligação amida entre o pantonato e a β -alanina, sendo dessa forma essencial para a sobrevivência deste microorganismo (HUNG et al, 2016).

2.2.2 Outro alvo

2.2.1.4 Diidrofolato redutase (DHFR):

Diidrofolato redutase (DHFR) pertence à via da biossíntese de folato, catalisando a conversão de diidrofolato em tetraidrofolato, um cofator na produção de timidilato, essencial para a síntese de DNA, RNA e proteínas. Assim como foi descrito para inibidores de MptpB, derivados indólicos contendo grupo carbonila na posição 3 do anel indólico, têm sido explorados como inibidores de DHFR (REDDY & PAL. 2020). Diversos inibidores de DHFR são conhecidos, a exemplo do metotrexato. No entanto, a maioria desses compostos não apresentam ação seletiva na enzima DHFR do *Mycobacterium*, exercendo também atividade inibitória na enzima humana.

2.3 Produtos Naturais: fonte de novos fármacos

Nos últimos anos, o ambiente marinho tem sido considerado como uma fonte valiosa de diversos produtos naturais, despertando o interesse da comunidade

científica por representar, devido à sua diversidade, uma fonte privilegiada de prospecção de novos fármacos, aumentando as perspectivas para a descoberta de produtos inovadores com aplicabilidade, tanto farmacêutica, quanto cosmética, veterinária, alimentícia, bioenergia e biotecnológica estrutural (CARDOZO et al., 2007, NEWMAN, et al., 2006, HAEFNER, 2003; ABAD & BERNEJO, 2001, COSTA-LOTUFO et al., 2009, DIETZMANN et al. 1997, FAULKNER, 2000, BARBOSA et al., 2020).

A diversidade química presente nessas moléculas forneceu muitas substâncias bioativas. Como exemplo temos a trabectidina, comercializado com o nome de Yondelis, um fármaco antitumoral isolado do urocordado *Ecteinascidia turbinata* (RINEHART, 2000), a pseudopterosina A, isolada do coral *Pseudopterogorgia elisabethae* e comercializada como substância ativa de uma linha de cremes faciais, Resilience, da Estée Lauder (LOOK et al, 1986; ROUSSIS et al., 1990); a conotoxina, isolado do molusco *Conus magnus*, anti-inflamatório neuropático, sendo outro exemplo de sucesso para a indústria farmacêutica, comercializado com o nome Prialt (Ziconotide) (KANZAKI et al., 2002; PROKSCH et. al., 2003).

Em relação à biodiversidade, o Brasil encontra-se entre os 10 primeiros países no ranking mundial e, por apresentar uma das maiores áreas costeiras na região tropical do planeta, tem despertado o interesse da comunidade científica para as pesquisas na área de biotecnologia marinha.

No nosso país, vários estudos com organismos de origem marinha estão sendo conduzidos na busca racional de bioprodutos de valor agregado e, no ano de 2010, foram criados quatro Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia em Ciências do Mar. Dentre eles, enfatizamos o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais (INCTAmbTropic)- coordenado pelo Prof. Dr. José Maria Landim Domingues da UFBA. Este instituto reúne instituições de ensino e pesquisa da Região Norte e Nordeste do Brasil, dentre elas, a Universidade Federal da Paraíba (UFPB), participando com o subprojeto “*Bioprospecção de Produtos Naturais de Origem Marinha*” que tem como objetivo a descoberta de moléculas oriundas das algas de espécies de *Caulerpa*, que poderão servir como modelos estruturais para síntese ou semi-síntese de moléculas orgânicas bioativas, bem como contribuir para o desenvolvimento de novos bioprodutos e/ou bioprocessos, patentear princípios ativos de origem marinha e, principalmente, tornar possível a

transferência dos conhecimentos adquiridos na pesquisa básica na área de desenvolvimento de bioprodutos e/ou bioprocessos ao setor produtivo.

Estudos realizados pelo grupo da UFPB com extratos da alga *Caulerpa racemosa* (Figura 3) e com a substância majoritária dessa espécie, o alcaloide indólico caulerpina (CLP), comprovaram a importância desse produto marinho em modelos farmacológicos, tais como de inflamação, antinociceptivo, antiespasmódico, antiviral e leishmanicida (FRANÇA et al., 2017; MIOSO et al., 2017; DA MATA et al., 2015; BITENCOURT et al., 2015; FRANÇA et al., 2014; CAVALCANTE-SILVA et al., 2014; DA MATTA et al., 2011; BITENCOURT et al., 2011; SOUZA et al., 2009a; SOUZA et al., 2009b; ABRANTES et al., 2010; CAVALCANTE-SILVA et al., 2013; CAVALCANTE-SILVA et al., 2016).

Figura 3: Estrutura da *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh (SALTCORNER, 2016).



Fonte: www.google.com.br. Acessado em: 01/03/2018.

A potência farmacológica observada do alcaloide CLP levou Castro (2017) e Sousa (2016) a sintetizarem 21 (vinte e um) derivados de caulerpina (sendo 19 dessas moléculas inéditas), cujo objetivo foi avaliar quais regiões moleculares poderiam tolerar modulação estrutural na avaliação da atividade antiviral e leishmanicida. A semisíntese destas moléculas partiu de modificações da molécula CLP isolada de *Caulerpa racemosa* (resultados não publicados).

Dessa forma, diante do potencial farmacológico apresentado tanto pela CLP quanto pelos seus derivados em vários modelos farmacológicos, os estudos das

suas propriedades farmacológicas correlacionados à estrutura molecular, faz-se necessário.

Uma das técnicas mais utilizadas para o estudo da relação química e atividade biológica para entendimento da relação estrutura atividade (REA) é a triagem virtual computacional, que através de bibliotecas químicas com aplicação de inúmeras ferramentas computacionais de quimioinformática, desempenham um papel indispensável no design moderno da descoberta de moléculas bioativas.

2.4 Estudo *in silico*

A triagem virtual (*Virtual Screening*, VS) é uma estratégia *in silico* bastante difundida que emprega os métodos de docagem molecular. Esta técnica envolve a análise de grandes bases virtuais de compostos, através de métodos computacionais, com o objetivo de identificar um pequeno subgrupo de compostos (sintéticos e/ou naturais) para avaliação da atividade biológica (KLEBE, 2006). A triagem virtual permite a seleção de milhares de compostos que são submetidos a um grande número de testes biológicos automatizados (WERMUTH, 2003), e têm contribuído, entre outras aplicações, para a análise eficiente de dados, a filtragem de coleções de compostos, para selecionar moléculas para avaliação experimental, a geração de hipóteses, para ajudar a compreender o mecanismo de ação de drogas e o desenho de novas estruturas químicas. Além disso, métodos computacionais têm feito contribuições significativas para o desenvolvimento de medicamentos que estão em uso clínico (SALDÍVAR-GONZÁLEZ; PRIETO-MARTÍNEZ; MEDINA-FRANCO, 2017).

Essa técnica apresenta-se como uma ferramenta fundamental no processo de desenvolvimento de novos fármacos, tornando-se cada vez mais importante devido às mudanças na legislação e aos fatores éticos e econômicos para redução dos testes em animais (HEWITT et al., 2015). Através dela, são utilizadas ferramentas computacionais de quimioinformática e o entendimento do desenho moderno de medicamentos, auxiliando na redução de tempo e custo na descoberta e planejamentos desses fármacos (ACHARYA et al., 2011; SLIWOSKI et al., 2014).

Neste contexto, como etapa inicial para esse desenvolvimento, prioriza-se a identificação de possíveis ligantes para um alvo biológico, enquanto que nas etapas finais trabalha-se com foco nos ligantes que possuem propriedades físico-químicas,

farmacocinéticas e farmacodinâmicas ideais para que, finalmente, um fármaco possa ser inserido no mercado farmacêutico (CAVALCANTI, et al., 2019).

No passado, a maioria das descobertas eram realizadas ao acaso. Atualmente, são planejadas de forma inteligente, com técnica de abordagem direta e/ou indireta, utilizando a estrutura do receptor ou do ligante, respectivamente, através do Design de Drogas Baseado em Ligantes (LBDD) e Design de Fármaco Baseado em Estrutura (SBDD). No LBDD, a técnica utilizada no desenvolvimento de medicamentos é o Quantitativo - Métodos de relação de atividade de estrutura (QSAR), usados para avaliar, através modelos matemáticos, a previsão das propriedades físico-químicas, atividade e toxicidade, sendo possível identificar um composto com melhor perfil (VIANA, J.O.; SCOTTI, M.T.; SCOTTI, L. 2020).

Nessas técnicas, principalmente a de modelagem molecular (docking molecular e dinâmica molecular), grande foi a contribuição para o entendimento das complexidades das proteínas e suas interações com inibidores, colaborando assim, para o planejamento de novos compostos com atividade melhorada (FERREIRA et al., 2015).

Já na abordagem indireta, o planejamento de candidatos a fármacos é baseado em processos que utilizam ligantes já conhecidos para aquela atividade desejada, obtidos nas bibliotecas de compostos virtuais, permitindo que a síntese seja direcionada para moléculas com potencial atividade biológica (ACHARYA et al., 2011; GRINTER, ZOU, 2014; SLIWOSKI et al., 2014).

Dessa forma, sendo a CLP um alcaloide bisindólico e, considerando a versatilidade biológica do núcleo indol, este estudo utilizou metodologias *in silico*, métodos de QSAR e docking molecular, objetivando a realização de uma triagem da molécula CLP e seus derivados, baseada em receptor/alvo da bactéria do gênero *Mycobacterium tuberculosis*.

2.5 Versatilidade Biológica do Núcleo Indólico

2.5.1 Indóis

O anel indólico é um dos produtos naturais mais bioativos de moléculas extraídas de fontes naturais, apresentando grande versatilidade biológica, tais como: atividade antiviral (DEVOGELAERE et al., 2012), antitumoral (CAI et al., 2015), antibacteriana (KANAMARU et al. 2001) e antiparkinsoniana (KUMAR et al., 2010).

Em decorrência das diversas atividades biológicas relacionadas a esse núcleo heterocíclico, pesquisadores passaram a se interessar pela síntese de moléculas que possuíam esses núcleos. No mercado farmacêutico, no período de 2000 a 2021, 36 novos fármacos foram lançados, indicando sua grande importância terapêutica (SILVA et al., 2022).

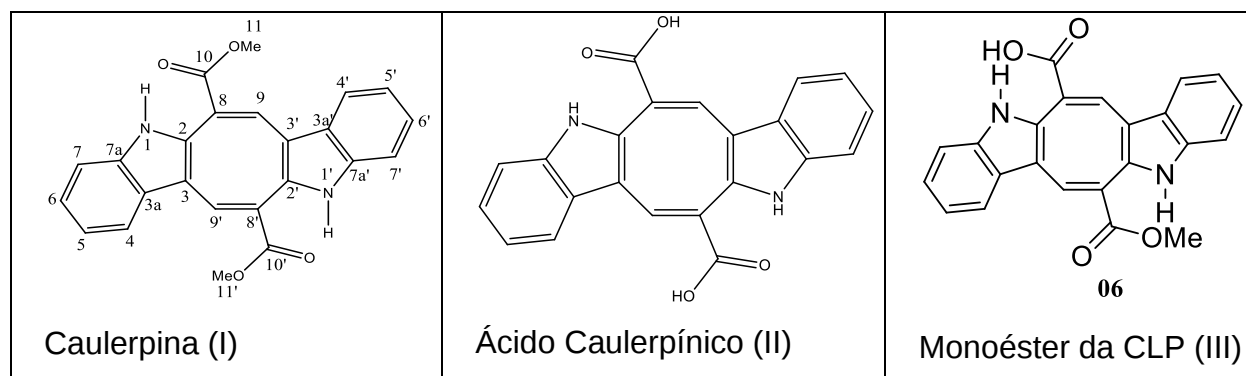
Dessa forma, devido à ampla atividade farmacológica e sua particularidade de se ligar a uma variedade de receptores (REDDY e PAL 2020), o núcleo indólico é considerado uma estrutura privilegiada na química medicinal. Nos últimos anos, moléculas derivadas do indol surgiram como um esqueleto versátil para desenvolvimento de vários protótipos com atividade anticâncer, antiviral, anti-TB, antiinflamatório, antioxidante, analgésico, modulador do receptor 5-HT_{2C}, antimalárico, anti-hipertensivo, anti-hiperglicemiante, anti-Parkinson e gastroprotetora (AYYAD & BADRIA, 1994; HARDEN et al., 2009; DEMURTAS et al., 2019; SHAREEF et al., 2019; TARIQ et al., 2020; REDDY e PAL, 2020).

Recentemente, Etchart et al. (2021) utilizaram substâncias derivadas do indol (3-aril-1*H*-indois) como inibidores *in vitro* do crescimento de cepa *Mtb* H37Rv, utilizando a isoniazida como controle positivo. De acordo com os valores da concentração inibitória mínima (MIC) exibidos para os compostos testados, inferiores a 20µM, os resultados obtidos foram satisfatórios pois demonstraram um efeito inibitório interessante, com atividade contra cepa sensível e cepas MDR, sem resistência cruzada.

2.5.2 Caulerpina (CLP)

A CLP contém dois grupos indoís ligados por um anel cíclico, contendo oito carbonos com dois grupos carboxi. A estrutura do CLP foi isolada pela primeira vez por Aguilar-Santos (1970), a partir de uma extração etílica da espécie *Caulerpa racemosa*, que se apresentou na forma de pequenos cristais vermelhados e, posteriormente, foi revisada por Maiti et al. (1978). Dois análogos de CLP (I) foram isolados de *C. racemosa*, o ácido CLP (II) e o monoéster da CLP(III) (Figura 4) (ANJANEYULU et al., 1991).

Figura 4: Substâncias marinhas isoladas da *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh.



Fonte: Santos, B.V.O. e Colaboradores.

A caulerpina é um dímero do ácido 3-indol-acrílico, isolado de mais de 12 espécies de *Caulerpa*, de *Codium decorticans*, *Halimeda incrassata*, das algas vermelhas *Laurencia majuscula*, *Hypnea musciformis*, *Caloglossa leprieuri* e *Chondria armata* (GÜVEN et al., 2010; GOVENKAR & WAHIDULLA, 2000). O seu rendimento varia de espécies de *Caulerpa*, como por exemplo, em *Caulerpa* sp. são 15% para *C. lentilifera*, 5% para *C. racemosa*, 2% para *C. microphysa* e 8% para *C. sertulorides*.

Embora a CLP tenha sido isolada pela primeira vez há mais de 52 anos, somente na década 60 que foi identificada como uma molécula bioativa. Vários relatos científicos mencionaram as propriedades farmacológicas de CLP, tais como, atividade antiinflamatória, antinociceptiva, espasmolítica e antituberculose (SOUZA et al., 2009b; CAVALCANTE-SILVA et al., 2013; CAVALCANTE-SILVA et al., 2016; CANCHÉ-CHAY et al., 2014).

Esteves et al., (2019) estudaram sua atividade antiviral contra o vírus da Chikungunya, que apresentou efeito inibitório de EC₅₀ muito significativo e promissor de 0,8 µM, enquanto que a atividade virucida se mostrou muito eficiente, sendo capaz de inibir cerca de 90% da infectividade viral em concentração de 5 µM. Macedo et al. (2012) descreveram a CLP também como uma molécula alternativa ao aciclovir®, durante o tratamento de infecções por HSV-1 (vírus do herpes simples humano), através da inibição das fases alfa e beta do ciclo de replicação viral. Cuomo et al. (2021), tentaram combater a inflamação crônica provocada pelo *Helicobacter pylori* modulando a resposta imune, visando receptores de peptídeo formil (FPRs) e

a proteína G acoplada, receptores que desempenham papéis-chave tanto na regulação, quanto na resolução da inflamação inata. Através dos seus estudos *in vitro*, constataram que a CLP atuou contra o infiltrado da cultura de *H. pylori*, revertendo a cascata de sinalização relacionada ao FPRs, neutralizando assim, a reação inflamatória desencadeada pelo peptídeo Hp (2–20), reduzindo significativamente a resposta imune em culturas de *H. pylori*.

Assim, diante desta variedade de propriedades farmacológicas apresentadas, foi descrita a síntese desse produto natural, partindo-se de soluções de moléculas indólicas e com rendimentos superiores ao observado em processos de extração e purificação de produtos naturais, obtendo-se a CLP e seus derivados, que foram submetidos aos estudos de modelagem molecular, utilizando proteínas alvo de *Mycobacterium tuberculosis* e a avaliação *in silico* e *in vitro* desses compostos.

3.OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Sintetizar e avaliar o potencial antimicobacteriano da CLP e seus derivados em modelos de *Mycobacterium tuberculosis*, através de estudos *in silico* e *in vitro*, como uma etapa inicial para o desenvolvimento de protótipos candidatos a fármacos para tratamento da tuberculose.

3.2 Específicos:

- Realizar estudos de modelagem molecular utilizando proteínas alvo de *Mycobacterium tuberculosis* e como ligantes o alcalóide indólico CLP e seus análogos;
- Construir um modelo preditivo utilizando metodologias *in silico* da CLP e seus derivados;
- Isolar o alcalóide bisindólico CLP obtido do extrato metanólico da *Caulerpa racemosa* através de métodos cromatográficos;
- Sintetizar derivados da CLP com diferentes substituintes na função éster;
- Avaliar *in silico* a biodisponibilidade oral e propriedades de absorção, distribuição, excreção e toxicidade;
- Realizar testes *in vitro* para determinação da susceptibilidade de micobactérias aos compostos por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em cultura de *Mycobacterium tuberculosis*.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

Devido ao grande potencial farmacológico da CLP já reportado em diversos trabalhos, realizou-se o estudo *in silico* da CLP e seus derivados bisindólicos sintetizados por Sousa (2016) e Castro (2017). Dessa forma, foi construído um modelo preditivo, no qual diferentes tipos de descritores moleculares foram calculados para o banco de moléculas que apresentam atividade conhecida contra *Mycobacterium tuberculosis*. A CLP e seus derivados ésteres foram, então, usados para investigar as atividades antituberculosas previstas. Os modelos foram gerados pelo algoritmo RF, e os descritores moleculares foram calculados usando o software Dragon 7. O modelo foi criado usando um método de validação externa.

Posteriormente, após observar o perfil de desempenho do modelo, as moléculas mais promissoras foram sintetizadas para serem encaminhadas para os testes *in vitro*, com o objetivo de determinar a suscetibilidade à micobactéria causadora da tuberculose. Foram também descritas metodologias *in silico*, para observar a toxicidade e propriedades farmacocinéticas (Figura 5).

4.1 TRIAGEM VIRTUAL

As simulações e análises computacionais foram realizadas na estrutura do Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas sob a supervisão do Prof. Dr Marcus Tullius Scotti e sua equipe.

4.1.1 Seleção dos compostos e dados de atividade biológica

Neste trabalho, foram selecionados ésteres da CLP obtidos por semi-síntese, segundo metodologia de Sousa (2016) e Castro (2017) (Figura 6)

Figura 5: Proposta de fluxo de trabalho que foi utilizada para a triagem virtual, isolamento, identificação e atividades *in silico* e *in vitro* da CLP e derivados.

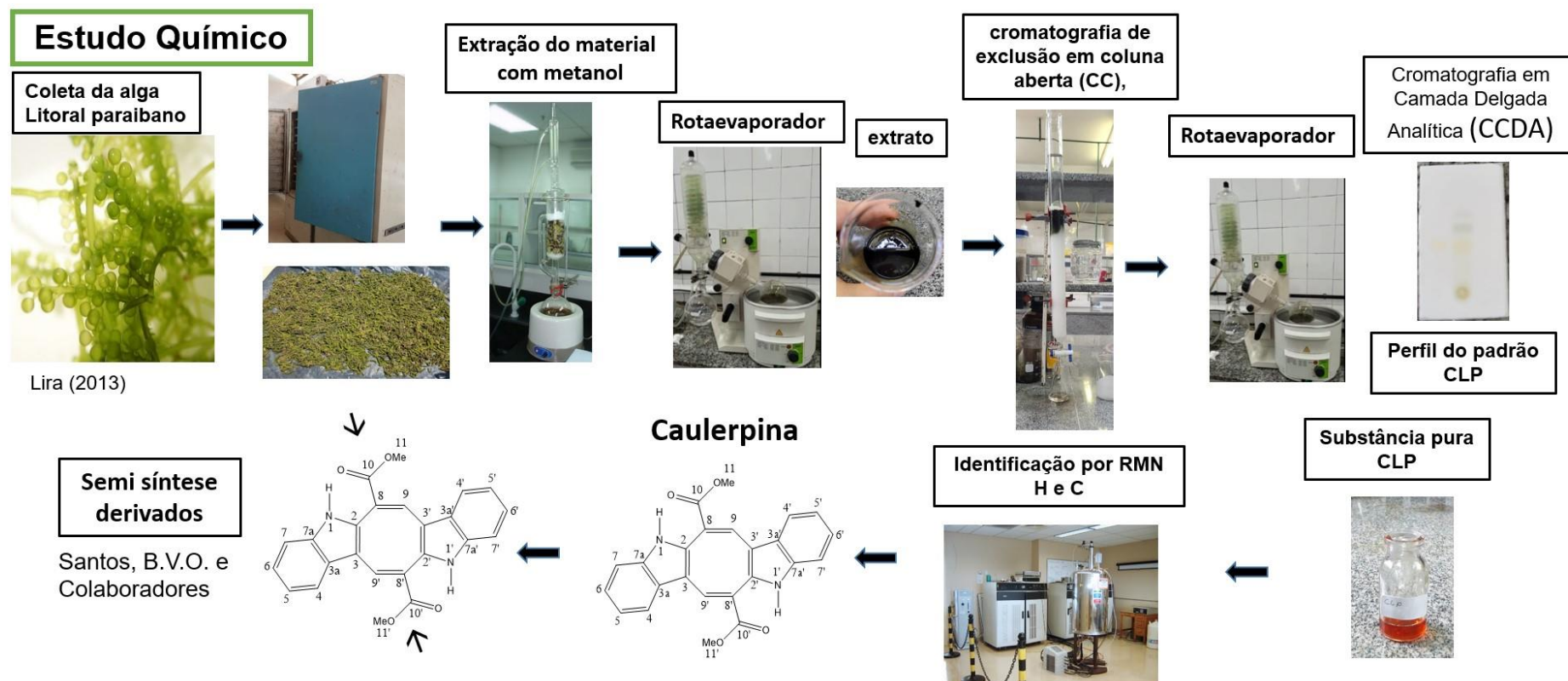
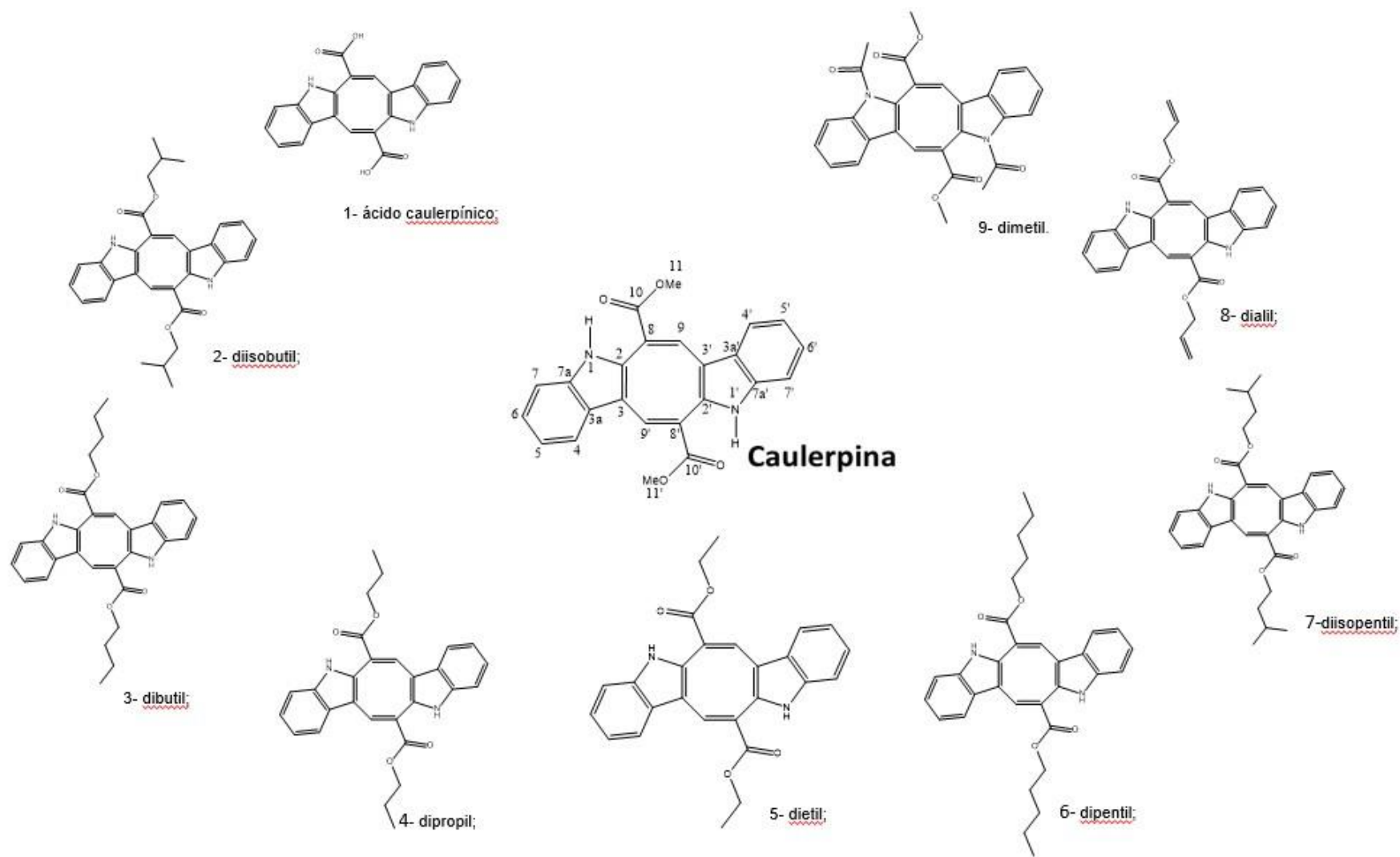


Figura 6: Derivados da Caulerpina com diferentes substituintes na porção éster



4.1.2 Modelo de Predição

Para a construção do modelo de classificação, faz-se necessária a presença de uma série de predição. As moléculas em estudo, tratam-se de 09 compostos semissintéticos derivados ésteres da Caulerpina, já mencionados na seção anterior.

4.1.3 Banco de Dados do Modelo e curagem de dados

Foi elaborado um modelo de predição, sendo este referente a compostos que apresentam atividade inibitória do *Mycobacterium tuberculosis* (*in vitro*). O conjunto de dados para elaboração do modelo de classificação foi obtido a partir da base de dados eletrônica ChEMBL Data Base (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)(EMBL-EBI, 2019). Estes dados tratam-se de compostos químicos testados *in vitro*, e com atividade inibitória do microorganismo em estudo. Os compostos foram classificados de acordo com o valor da pIC_{50} ($-\log IC_{50}$ (mol/L)), a qual representa a concentração necessária para a inibição de 50% da linhagem celular em estudo.

O conjunto de dados referente a inibição do *Mycobacterium tuberculosis* (*in vitro*), (ChEMBL ID: 360), era constituído por 582 compostos em seu total, sendo que os compostos classificados como ativos, consistiram em um total de 311 compostos e apresentaram $pIC_{50} \geq 5.23$, já os compostos inativos possuíam valores de $pIC_{50} \leq 4,87$ e totalizaram 271 compostos.

A curagem de dados do banco em estudo iniciou com a remoção das duplicatas no Programa Microsoft Excel (<https://office.live.com/>)(MICROSOFT EXCEL, 2019). A etapa de remoção de duplicatas faz-se importante, pois possibilita avaliar a qualidade dos dados experimentais e remover as estruturas químicas com registro duplicado dos experimentos, representando assim um dado experimental conflitante que afeta a qualidade do modelo (FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2010). Após a remoção das duplicatas ocorreu a padronização dos valores do pIC_{50} e a posterior divisão das moléculas do banco em ativas e inativas.

Os SMILES correspondem a representação canônica da estrutura química do composto, estes foram utilizados como dados de entrada para as etapas posteriores, as quais consistiram em: (1) conversão das estruturas em 3D e padronização, realizada no software Standardizer program [JChem 17.18.0.1784, 2017, ChemAxon (<https://chemaxon.com/>)](CHEMAXON, [s.d.]). O protocolo de padronização incluiu

a adição de átomos de Hidrogênio, Aromatização das estruturas e Remoção de sais; e (2) Obtenção dos descritores moleculares.

Com relação a padronização das moléculas da série de teste, estas foram desenhadas no programa Marvin Sketch 22.13 software, ChemAxon (<https://chemaxon.com/>)(CHEMAXON, [s.d.]). Após a obtenção do desenho, os compostos em estudo foram padronizados e convertidos em 3D pelo software Standardizer program [JChem 17.18.0.1784, 2017, ChemAxon (<https://chemaxon.com/>)](CHEMAXON, [s.d.]).

4.1.4 Descritores Moleculares

Os descritores correspondem a uma informação quantitativa sobre a identidade química da molécula. O cálculo de descritores foi utilizado para prever as propriedades biológicas e físico-químicas das moléculas em estudo. A determinação dos descritores é possibilitada quando as moléculas são convertidas em uma representação molecular que permite o tratamento matemático (BARROS, 2017).

Neste trabalho foram utilizados os descritores pertencentes ao software Dragon 7.0, o qual apresenta a capacidade de calcular 5.270 descritores moleculares, os quais estão distribuídos em 30 blocos lógicos e abrangem abordagens teóricas diversas (Kode Chemoinformatics (https://chm.kode-solutions.net/products_dragon.php))(KODE INFORMATICS SRL, 2019).

4.1.5 Modelo de Predição e Validação Estatística

A elaboração do modelo de classificação, como também as análises estatísticas e avaliação da sua performance foram realizadas no KNIME 3.4.0 software (KNIME 3.4.0 The Konstanz Information Miner Copyright, 2003-2018) (<https://www.knime.com/>)(“Knime”, [s.d.]).

O banco de moléculas importado no *software* foi particionado pela ferramenta “*Partioning*” com a opção de “Amostra estratificada”, ocorrendo, dessa forma a separação em Treino e Teste, o que representa percentuais de 80% e 20% de todos os compostos em estudo, respectivamente, ocorrendo assim, a seleção aleatória, porém preservando sempre a mesma proporção de substâncias ativas e inativas, em ambos os conjuntos de dados sob estudo.

O Random Forest (RF) foi utilizado como algoritmo de cálculo, o qual caracteriza-se como um algoritmo supervisionado que se baseia na combinação de árvores de predição, de uma forma em que cada árvore depende dos valores de um vetor aleatório amostrado de forma independente e mantém-se a mesma distribuição de árvores na floresta (ACEVEDO, 2017; BREIMAN, 2001). A configuração utilizada durante as análises correspondeu a 200 árvores e a uma semente (seed) para a geração de números aleatórios (200-1).

Um outro artifício utilizado na avaliação foi o “*Domínio de Aplicabilidade*”, responsável por analisar os compostos dos conjuntos de testes, avaliando a confiabilidade das predições realizadas, como também compreende um espaço químico teórico que abrange os descritores do modelo e a resposta modelada que permite estimar a incerteza na previsão de um composto no conjunto de treinamento empregado no desenvolvimento do modelo (ROY; KAR; AMBURE, 2015). Este parâmetro é calculado de acordo com a fórmula:

$$DA = d + Z\sigma$$

Em que:

- d e σ : equivalem as distâncias euclidianas e o desvio padrão médio, respectivamente, dos compostos no conjunto de treinamento;
- Z : representa um valor de corte empírico.

Neste trabalho, o valor de Z utilizado foi 0,5 (ROY; KAR; AMBURE, 2015).

A avaliação da performance do modelo, sendo as performances dos testes internos e externos do modelo elaborado foram avaliadas quanto a quatro parâmetros, correspondendo a respectivamente: 1) Sensibilidade, que equivale a taxa de verdadeiros positivos, ou seja, a taxa de compostos realmente ativos; 2) Especificidade, a qual corresponde a taxa de verdadeiros negativos, ou seja, os compostos realmente inativos e 3) Precisão, que denota a taxa de previsibilidade geral do modelo. O desempenho do modelo foi avaliado pela curva *Receiver Operating Characteristic (ROC)*, este parâmetro avalia a sensibilidade e especificidade e, para a avaliação do desempenho global, foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Matthews (do inglês, *Matthews Correlation Coefficient - MCC*), visto que, este parâmetro correlaciona as classificações binárias observadas e preditas, resultando em um valor situado entre -1 e +1, em que +1 indica uma predição perfeita; -1 corresponde a um total desacordo entre o valor predito e o observado; já o 0

demonstra uma previsão aleatória (MATTHEWS, 1975). Este parâmetro é representado pela seguinte fórmula:

$$MCC = \frac{VP \times VN - FP \times FN}{\sqrt{(VP + FP)(VP + FN)(VN + FP)(VN + FN)}}$$

Em que:

TP: Verdadeiro positivo (Variável positiva, classificada como positiva);

TN: Verdadeiro Negativo (Variável negativa, classificada como negativa);

FP: Falso Positivo (Variável negativa, classificada como positiva);

FN: Falso Negativo (variável positiva, classificada como negativa).

4.1.6 Identificação dos resíduos que fazem contato com os ligantes

A identificação dos resíduos que interagem com cada um dos ligantes presentes nas estruturas do PDB, é de extrema importância para entendermos a dinâmica do seu sítio ativo. Para a identificação dos aminoácidos em contato com os ligantes foi utilizado o programa LIGPLOT (WALLACE et al., 1995), um programa amplamente utilizado e bem estabelecido para esta finalidade.

4.1.7 Região do sítio ativo utilizado

Foram utilizados novos inibidores seletivos para a InhA, DprE1, pantontenato sintase e DHFR de *Mtb*. Levando em consideração que o NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) é ligante de diversas outras enzimas no organismo humano, e que participa de muitas outras vias metabólicas, o foco foi o sítio de ligação do substrato. Por isso, nas simulações computacionais de triagem, deixou-se o NADH fazendo parte da proteína “bloqueando” seu sítio de ligação, deixando livre apenas o sítio de ligação do substrato.

4.1.8 Obtenção e preparo dos ligantes

Inicialmente, foram preparados os ligantes utilizados em estudo. Os controles positivos Moxifloxacino (Inibidor da DNA Girase – Topoisomerase II), Rifampicina (Inibidor da RNA Polimerase) e derivados sintéticos da Caulerpina (Compostos teste) foram desenhados no programa Marvin Sketch (ChemDraw), salvos como arquivos.cdx e convertidos em formato .sdf pelo programa MarvinSketch 22.13 (<https://chemaxon.com/products/marvin>) (ChemAxon Marvin Sketch). Em seguida

realizou-se a padronização das estruturas químicas por meio da adição de átomos de Hidrogênios, padronização do anel aromático, remoção de sais e clean 3D no programa Standardizer 22.13 (<https://chemaxon.com/products/marvin>) (ChemAxon Standardizer) e submetidos posteriormente ao Docking molecular.

Todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina, em seguida foi criado um “template” entre a enzima e o ligante co-cristalizado, com a finalidade de demarcar o sítio ativo da macromolécula, seguindo o procedimento com a inserção da molécula teste e, por fim, realizada a simulação de Docking molecular. Previamente a realização da simulação de Docking molecular foi calculado o Desvio Quadrático Médio (RMSD) a partir das poses, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å (HUNG, et al., 2011).

4.1.9 Análise das simulações por Docking Molecular / Cálculo de acoplamento molecular e visualização das interações

Para a realização das simulações de Docking molecular, foi utilizado o software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) (CLC Bio Company Molegro Virtual Docker 6.0) com os parâmetros predefinidos neste. O ligante complexado foi usado para definir o sítio ativo. Em seguida, os compostos foram importados, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do algoritmo MolDock Score (DE AZEVEDO & WALTER, 2010; PRAKOESWA et al., 2020). O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por corre. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções Sp²-Sp².

Para a realização da visualização das interações e obtenção das figuras de acoplamento molecular, foi utilizado o software Discovery Studio Visualizer v20.1.0.19295 - BIOVIA (2020) (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) (Biovia Accelrys Discovery Studio 3.5).

4.1.10 Docagem Molecular

O Docking molecular foi utilizado para investigar o mecanismo de ação dos compostos derivados sintéticos da caulerpina que contribuíssem para efeito inibitório do *Mycobacterium tuberculosis*, através da afinidade de ligação dos compostos às enzimas selecionadas no estudo. Para isso, foi realizado um rastreio com quatro proteínas envolvidas nessa atividade. As estruturas 3D das enzimas foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (RCSB Protein Data Bank; BERNSTEIN et al., 1997). As proteínas selecionadas e informações detalhadas sobre elas podem ser visualizadas na tabela 01.

Tabela 01 - Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo.

Proteína	PDB ID	Ligante PDB	Resolução
Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1)	4NCR (MARAKOV et al., 2014)	2-(4-(ciclohexilmetil)piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-benzo[e][1,3]tiazin-4-ona (26J)	1.88 Å
Pantotenato sintetase	4MUE (HUNG, et al., 2016)	ácido [5-metoxi-2-({[4-(trifluorometil)fenil]sulfonil}carbamoil)-1H-indol-1-il]acético (2DH)	2.06 Å
Enoil-ACP redutase	4TRO (CHOLLEt et alk., 2015)	4-(2-hidroxietil)-1-piperazina ácido etanossulfônico (EPE)	1.40 Å
Diidrofolato Redutase	5JA3 (HAJIAN et al., 2016)	Ácido 4-[3-[3-[2,4-bis(azanil)-6-etil-pirimidin-5-il]prop-2-inil]-4-metoxi-fenil]benzóico (U06)	1.81 Å

Observação: De forma semelhante ao teste *in vitro*, os fármacos **MOX** e **RIF** foram utilizados como controles.

4.2 ESTUDO QUÍMICO - Metodologia utilizada para obtenção das moléculas

Local de execução: As atividades de isolamento e síntese de CLP e seus análogos foram desenvolvidas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2.1 Coleta do material:

A espécie *C. racemosa* foi coletada no litoral da cidade de Pitimbu, Paraíba, coordenadas 7°07'31"S; 34°49'25", durante marés de sizígia (-0,2 a 2,0), ou seja, de acordo com as tabelas disponibilizadas on-line pelo Instituto Hidrográfico (www.hidrografico.pt). A identificação da alga foi efetuada com base em bibliografia especializada e técnicas correntes para identificação de macroalgas e atualizada de acordo com WYNNE (1998). A espécie foi coletada no intervalo entre os dias 26 de outubro de 2019 a 21 de fevereiro de 2020 e identificadas pelo Prof. Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda do Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB. Foram preparadas excisatas e depositadas na seção de criptógamos do herbário Lauro Pires Xavier (JPB – DSE/UFPB). O material coletado foi seco ao sol e, posteriormente, submetido à exaustiva extração com metanol, seguindo-se a sua concentração em rotaevaporador, obtendo-se o respectivo extrato bruto.

4.2.2 Preparação do extrato metanólico

Após coletados, o material de origem marinha (CLP) foi triado para eliminar prováveis “contaminantes” epífitas e fauna associada. Em seguida, o material foi extraído *in natura* com solventes orgânicos (metanol) obtendo-se as soluções extrativas que foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e/ou liofilização, obtendo-se os respectivos extratos metanólicos.

4.2.3 Isolamento da Caulerpina (6E, 13E) -dimetil 5,12- dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)

A purificação da CLP foi realizada segundo a metodologia de Lira (2013) com modificações. Nesta etapa, o extrato bruto metanólico da *Caulerpa racemosa* foi submetido a cromatografia de exclusão em coluna aberta (CC), utilizando sephadex LH-20 da Merck como fase estacionária e como eluentes os solventes clorofórmio e

metanol (1:1). As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas ao perfil do padrão da *Caulerpina*, seguindo da Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

4.2.4 Derivados da Caulerpina para os estudos *in vitro*

As modificações estruturais da caulerpina, foram utilizadas metodologias já descritas por Sousa (2016). Todos derivados utilizados foram cedidos pelo grupo de Santos, B.V.O. e Colaboradores.

Derivados da caulerpina: (6*E*, 13*E*)-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-ácido dicarboxílico (ácido caulerpínico); (6*E*,13*E*)-diisobutil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (Diisobutil); (6*E*,13*E*)-dibutil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (Dibutil); (6*E*,13*E*)-dipropil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (Dipropil); (6*E*,13*E*)-dietil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (Dietil); (6*E*,13*E*)-dipentil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (Dipentil); (6*E*,13*E*)-diisopentil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (Diisopentil); (6*E*,13*E*)-dialil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (Dialil); (6*E*,13*E*)-dimetil 5, 12-diacetil-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (dimetil).

4.3 METODOLOGIA UTILIZADA PARA PREVISÃO DE PROPRIEDADES DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE.

Para as simulações e análises computacionais foi utilizada a estrutura do Laboratório de bioquímica da unidade acadêmica de ciências Biológicas do centro de saúde e tecnologia rural da UFCG sob a supervisão do Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Foram avaliadas nove substâncias teste derivadas da Caulerpina (ácido caulerpínico, CLP diisobutil, dibutil, dipropil, dietil, dipentil, diisopentil, dialil, dimetil). Todas as informações químicas, códigos smiles, destas substâncias-teste foram obtidas no site gratuito Pubchem® (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Por meio da comparação da estrutura química das moléculas em estudo com um banco de dados de moléculas com atividades biológicas definidas, softwares são utilizados prever a probabilidade teórica das moléculas em estudo atuarem sobre determinados alvos

farmacológicos. Essas ferramentas computacionais avaliam vários parâmetros teóricos da molécula em estudo nas fases iniciais de sua descoberta, o que possibilita selecionar os melhores candidatos para desenvolvimento bem como rejeitar aqueles com uma baixa probabilidade de sucesso (RAJASEKHAR et al., 2011).

4.3.1 Avaliação da biodisponibilidade oral *in silico*

Para a análise da biodisponibilidade oral teórica dos compostos derivados da caulerpina, alguns parâmetros foram analisados, segundo a “Regra dos Cinco” de Lipinski: (a) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH), menor ou igual a 10; (b) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH), menor ou igual a 5; (c) massa molecular (MM), menor ou igual a 500 g/mol; (d) coeficiente de partição octanol-água (milog P), menor ou igual a 5; (e) área de superfície polar (PSA), menor ou igual a 140 Å. Moléculas que não atendem mais do que um destes parâmetros podem ter problemas com a biodisponibilidade (SILVA, 2015). Para determinação dessa biodisponibilidade foi utilizado o programa Molinspiration Cheminformatics, um software gratuito encontrado no endereço: (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

4.3.2 Teste toxicológico *in silico*

As 9 (nove) substâncias - ácido caulerpínico, CLP diisobutil, dibutil, dipropil, dietil, dipentil, diisopentil, dialil, dimetil - foram submetidas ao estudo *in silico* para avaliação dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) e para verificação das predições do potencial Toxicidade AMES, Agentes Cancerígenos, Toxicidade Oral Aguda e Carcinogenicidade, utilizando endereço: (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>).

4.4 ESTUDOS *in vitro*

Os estudos *in vitro* foram realizados no laboratório de Biotecnologia de Microorganismos localizado no Centro de Biotecnologia (CBiotec), da Universidade Federal da Paraíba, sob supervisão do Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior.

4.4.1 Ensaio de suscetibilidade a micobactérias

4.4.1.1 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) em *Mycobacterium tuberculosis*

As concentrações inibitórias mínimas (MIC) das substâncias testadas foram determinadas na cepa H37Ra de *M. tuberculosis*. As MICs foram determinadas usando o ensaio de redução de resazurina em microplaca (REMA), como um indicador de crescimento. Foram utilizadas as moléculas antituberculosas usadas no tratamento da TB, RIF e MOX, como controles positivos. As substâncias testadas foram pesadas, tendo suas soluções preparadas em DMSO: CLP, ÁCIDO CLP, CLP DIISOBUTIL, DIPENTIL, DIETIL; em um primeiro ensaio. Em seguida, seguindo a mesma metodologia, foram avaliadas: CLP DIPROPIL, CLP DIISOBUTIL, CLP DIETIL, em um segundo ensaio. Foram preparadas soluções de trabalho usando caldo 7H9 Middlebrook (suplementado com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) para atingir as respectivas concentrações desejadas. Foram realizadas diluições em série em microplacas de 96 poços de poliestireno com fundo em U. A concentração de DMSO foi mantida a 2,5 % em todos os poços do ensaio. Após a adição das cepas bacterianas aos poços, procedeu-se com a incubação das microplacas à temperatura de 37 °C, durante 7 dias para *M. tuberculosis*. Após isso, 30 µL de uma solução de resazurina (0,02 %) foi adicionado a cada poço, e os resultados foram avaliados após 48 horas para *M. tuberculosis*. A MIC de cada molécula foi considerada como a menor concentração de fármaco que impede uma mudança de cor de azul (resazurina) para rosa (resorufina) (MURADÁS et al., 2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TRIAGEM VIRTUAL

5.1.1 Modelo de Predição

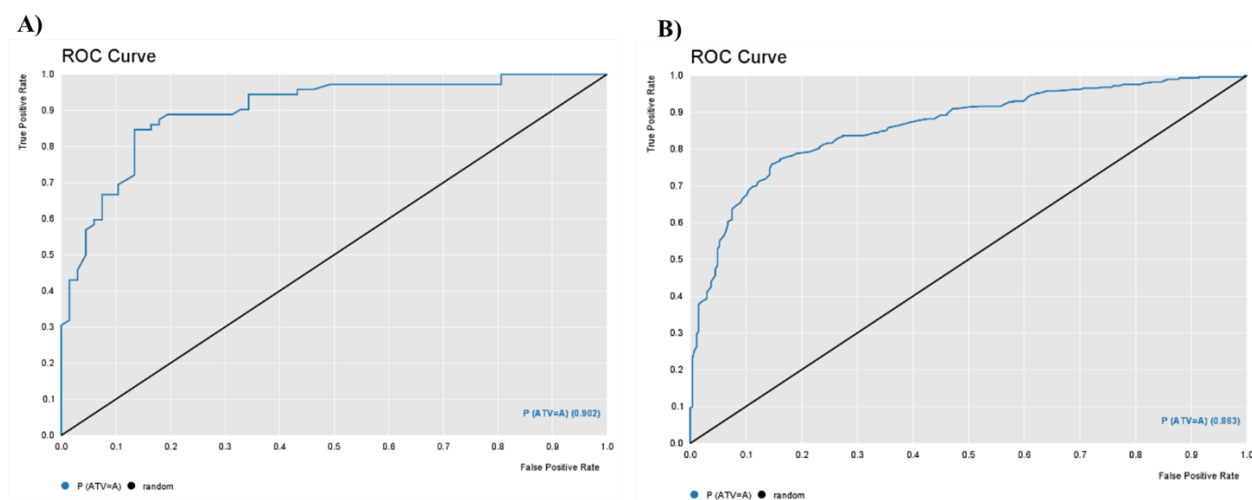
Para realizar a triagem virtual baseada no ligante (*Ligand Based*), um modelo de predição foi construído usando o algoritmo Random Forest (RF). Para a construção desse modelo, foram calculados descritores moleculares para o banco de moléculas com atividade inibitória conhecida para o *Mycobacterium tuberculosis*, obtido através do banco de dados ChEMBL.

O modelo de RF foi avaliado quanto ao seu poder preditivo, utilizando os parâmetros de especificidade, sensibilidade, precisão, exatidão (AUC), valor predito positivo (PPV) e valor predito negativo (NPV), além de desempenho e robustez, como também pela curva *Receiver's Operating Characteristic* (ROC) e coeficiente de correlação de Mathews (MCC). A Tabela 2 descreve as características dos modelos, em termos de poder preditivo e robustez, e a Figura 7 mostra o desempenho do modelo. De acordo com os resultados, foi observado que o modelo apresentou uma ótima classificação, desempenho e robustez.

Tabela 2: Resumo dos parâmetros correspondentes aos resultados obtidos para o modelo elaborado com os descritores Dragon 7.

Organismo	Validação	Especificidade	Sensibilidade	Acurácia	PPV	NPV	MCC	AUC
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Test	0.72	0.89	0.81	64	19	0.62	0.90
	Cross	0.77	0.81	0.79	233	62	0.57	0.86

Figura 7. Curva Receiver operating characteristic (ROC) gerada para o modelo Random Forest (RF) com os descritores Dragon 7. Legenda: (A) Teste e (B) Cross Validation.



Após a validação do modelo, os derivados ésteres da caulerpina foram analisados quanto à possibilidade de atividade no *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando o modelo de predição elaborado. Como o modelo elaborado demonstrou um bom desempenho, este foi utilizado para selecionar o composto potencialmente ativo para o *Mycobacterium tuberculosis*.

O algoritmo RF possibilitou selecionar compostos com potencial ativo, que apresentassem probabilidades ≥ 0.50 para a inibição do *Mycobacterium tuberculosis* (Tabela 3). Dessa forma, a maioria dos compostos apresentou probabilidades acima de 50%, com exceção do composto 8 ($p=0.44$), sendo possível classificá-los como potencialmente ativos, visto que, as probabilidades obtidas variaram entre 0.535 e 0.755, tendo os compostos 02 e 04 obtido os valores de probabilidade mais alta ($p=0.755$) e ($p=0.75$), respectivamente (Tabela 3). Além disso, o domínio de aplicabilidade foi confiável para todos os compostos em estudo, demonstrando que os compostos se encontram no espaço químico do modelo elaborado. Dessa forma, segundo os resultados demonstrados, os compostos derivados ésteres da caulerpina são potencialmente ativos para o *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabela 3: Probabilidade de atividade dos derivados sintéticos ésteres da Caulerpina contra o *Mycobacterium tuberculosis* avaliados pelo algoritmo Random

Forest (RF). Em negrito encontram-se destacados os compostos considerados ativos pelo modelo.

Composto	Probabilidade (%)	Domínio de Aplicabilidade (DA)	Predição
01- ÁCIDO CAULERPÍNICO	0.535	Confiável	Ativo
02- DIISOBUTIL	0.755	Confiável	Ativo
03- DIBUTIL	0.705	Confiável	Ativo
04- DIPROPIL	0.75	Confiável	Ativo
05- DIETIL	0.74	Confiável	Ativo
06- DIPENTIL	0.67	Confiável	Ativo
07- DIISOPENTIL	0.655	Confiável	Ativo
08- DIALIL	0.44	Confiável	Inativo
09- DIMETIL	0.565	Confiável	Ativo
10- CAULERPINA	0.58	Confiável	Ativo

Legenda: Em negrito, compostos com probabilidade acima de 50%. Em vermelho, composto com probabilidade mais alta.

Seguindo os resultados apresentados, o Docking molecular foi realizado nas três moléculas sintéticas que apresentaram melhores probabilidades de atividade: (02) CLP diisobutil, (04) CLP dipropil e (05) CLP dietil.

5.1.2 Estudo de *Docking molecular*

Os derivados sintéticos da Caulerpina foram submetidos ao rastreio por meio de Docking molecular em quatro proteínas. Os resultados foram gerados usando a função de pontuação Moldockscore. Valores mais negativos indicaram melhores previsões para a função de pontuação em estudo. A proteína em que os compostos obtiveram valores de energia de ligação menor ou próximo ao fármaco padrão, em pelo menos uma função de pontuação, foi considerada ativa.

Os resultados de docking gerados pelo algoritmo MolDock Score do programa foram validados pelo *redocking* do ligante cristalográfico com todas as proteínas investigadas. Os desvios da raiz quadrada média (RMSDs) das poses de ajuste obtidas foram calculados em comparação com a estrutura cristalina. Os valores RMSD inferiores a 2 Å indicam um grau ideal de confiabilidade de triagem. As informações sobre as estruturas de partida e os resultados da validação de *redocking* encontram-se na Tabela 4.

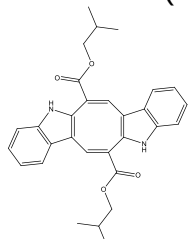
Tabela 4: Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo.

Proteína	Ligante PDB	RMSD
Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR)	26J	1.23
Pantotenato sintetase (PDB: 4MUE)	2DH	0.23
Enoil-ACP redutase (PDB: 4TRO)	EPE	0.17
Diidrofolato Redutase (PDB: 5JA3)	U06	1.92

Durante a análise de redocking, todos os valores de RMSD estavam abaixo de 2,0 Å, ou seja, as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo. No geral, os programas forneceram valores considerados satisfatórios para a validação do docking.

Após a realização do redocking, o estudo foi prosseguido com a realização do docking. Os resultados de docking podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de energia de ligação dos compostos derivados sintéticos da Caulerpina analisados nas quatro proteínas selecionadas no estudo. Os melhores resultados estão destacados em negrito e na cor vermelha.

Compostos	Alvos			
	Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR)	Pantotenato sintetase (PDB: 4MUE)	Enoil-ACP redutase (PDB: 4TRO)	Diidrofolato Redutase (PDB: 5JA3)
Caulerpina Diisobutil (02)	-142.953	-167.091	-117.998	-163.135
 Caulerpina Dipropil (04)	-114.574	-159.191	-122.632	-150.175
Caulerpina Dietil (05)	-109.194	-136.132	-108.978	-136.34
Moxifloxacino	-66.5821	-105.491	-53.9314	-111.351
Rifampicina	-144.167	-153.738	-151.008	-235.889
Lig PDB	-63.8621	-137.379	-46.3319	-155.802

Legenda: Em vermelho encontra-se o composto de menor energia e em negrito encontra-se o composto com valores de score menor que os controles e o ligante PDB.

Segundo os resultados apresentados na tabela 3, das quatro proteínas analisadas, os derivados sintéticos da Caulerpina obtiveram energias negativas em todas as enzimas em estudo, demonstrando, dessa forma, que ocorreu interação com todos os alvos em estudo. Além disso, o composto Caulerpina diisobutil (02) foi o composto de maior afinidade no alvo Pantotenato sintetase (PDB: 4MUE), como também foi observado que para os quatro alvos em estudo, os derivados da Caulerpina apresentaram maior afinidade quando comparados a pelo menos um dos controles em estudo.

5.1.3 Avaliação da interação molecular entre o composto Caulerpina diisobutil, os inibidores Moxifloxacino e Rifampicina, o ligante PDB (2-(4-(ciclohexilmetil) piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-benzo[e][1,3]tiazin-4-ona) e a macromolécula Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR).

Para a macromolécula Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR), o composto Caulerpina diisobutil apresentou score de energia menor que o inibidor Moxifloxacino, como também o ligante PDB (2-(4-(ciclohexilmetil) piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-benzo[e][1,3]tiazin-4-ona) no algoritmo MolDock Score, correspondendo a $-142.953 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, enquanto que os inibidores Moxifloxacino e Rifampicina apresentaram score correspondente a $-66.5821 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e $-144.167 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (a Rifampicina foi o composto de maior afinidade). Já o ligante PDB 2-(4-(ciclohexilmetil) piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-benzo[e][1,3] tiazin-4-ona demonstrou valores de $-63.8621 \text{ Kcal.mol}^{-1}$.

Além disso, observou-se (figura 8) que as interações do composto Caulerpina diisobutil são do tipo ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas em verde), que se formam entre átomos polares, sendo observadas nos átomos de oxigênio (O) do grupamento éster por meio dos resíduos Gly 133 (1 interação), Gly 117 (1 interação), Lys 418 (1 interação) e Cys 387 (1 interação). Os átomos de Carbono (C) da estrutura química dos compostos foram fundamentais para o estabelecimento das interações do tipo hidrofóbicas (linha tracejada em rosa), sendo observado os resíduos Tyr 314 (1 interação), Val 365 (3 interações), Lys 367 (1 interação) e Cys 387 (1 interação). As interações estéricas, 9 linhas tracejadas em vermelho e em laranja, foram o último grupo de interações visualizadas, sendo que estas foram observadas nos átomos de Carbono (C) dos anéis por meio dos resíduos Cys 387 (2 interações), como também foram perceptíveis nos átomos de Hidrogênio (H) do grupamento amina através do aminoácido Lys 134 (1 interação) e do grupamento éster por meio do resíduo Cys 387 (1 interação). Vale salientar que os

resíduos Val 365, Cys 387, Gly 117 e Lys 418, são resíduos observados no sítio ativo da enzima Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR) (MAKAROV et al., 2014).

O fármaco controle Moxifloxacino apresentou interações do tipo hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa), interações estéricas (linhas tracejadas em laranja) e interações do tipo ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde). As ligações de hidrogênio foram observadas nos átomos de Oxigênio (O) do grupamento carbonila por meio dos resíduos Cys 387 (1 interação), Asn 385 (1 interação), His 132 (1 interação). Além disso, também foram visualizadas ligações de hidrogênio os átomos de Oxigênio (O) do grupamento éter por meio do resíduo Gly 117 (1 interação). Os grupos cíclicos da estrutura química do composto foram essenciais para o estabelecimento das interações hidrofóbicas e das interações estéricas, sendo os resíduos envolvidos referentes a: Lys 134 (1 interação), Cys 387 (2 interações) e Val 365 (2 interações). Ocorreram interações semelhantes entre o controle Moxifloxacino e o composto Caulerpina-diisobutil, sendo correspondente as interações do tipo ligações de hidrogênio através dos resíduos Cys 387 e Gly 117, nas interações hidrofóbicas através do resíduo Val 365, como também nas interações estéricas pelo resíduo Cys 387.

Para o fármaco controle Rifampicina foram observadas apenas interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e interações do tipo ligação de hidrogênio (linhas tracejadas em verde). As ligações de hidrogênio ocorreram em menor número e foram observadas apenas no átomo de Hidrogênio (H) do grupamento amina por meio do aminoácido Ser 228 (1 interação). As interações hidrofóbicas foram mais prevalentes, sendo observadas nos átomos de Carbono (C) dos grupamentos metilas (CH₃) do composto, além dos grupamentos (CH₂) dos anéis, os resíduos observados compreenderam Trp 230 (2 interações), Leu 363 (1 interação), Cys 387 (2 interações), Val 365 (3 interações) e His 132 (1 interação). Isso demonstra uma maior contribuição dos grupamentos apolares da estrutura química do fármaco Rifampicina ao sítio ativo da enzima Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR). Foram observadas interações semelhantes entre o fármaco Rifampicina e o composto Caulerpina-diisobutil, sendo correspondentes aos resíduos Cys 387 e Val 365.

O ligante PDB (2-(4-(ciclohexilmetil) piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-benzo[e][1,3]tiazin-4-ona) apresentou interações estéricas (linhas tracejadas em laranja e vermelho), interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e interações do tipo ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde). As interações estéricas ocorreram

em menor número, sendo observadas nos átomos dos anéis aromáticos por meio do resíduo Cys 387 (3 interações). As interações hidrofóbicas foram observadas nos átomos de Carbono (C) da estrutura química do composto por meio dos aminoácidos Trp 230 (1 interação), Val 365 (3 interações), Lys 367 (1 interação) e His 132 (1 interação). As interações do tipo ligação de hidrogênio foram observadas nos átomos de Flúor por meio dos resíduos Gly 133 (1 interação), Lys 134 (1 interação) e His 132 (1 interação). Foram observadas interações semelhantes correspondentes as ligações de hidrogênio por meio do resíduo Gly 133, as interações hidrofóbicas observadas nos aminoácidos Lys 367 e Val 365. O resíduo Cys 387 foi coincidente nas interações estéricas.

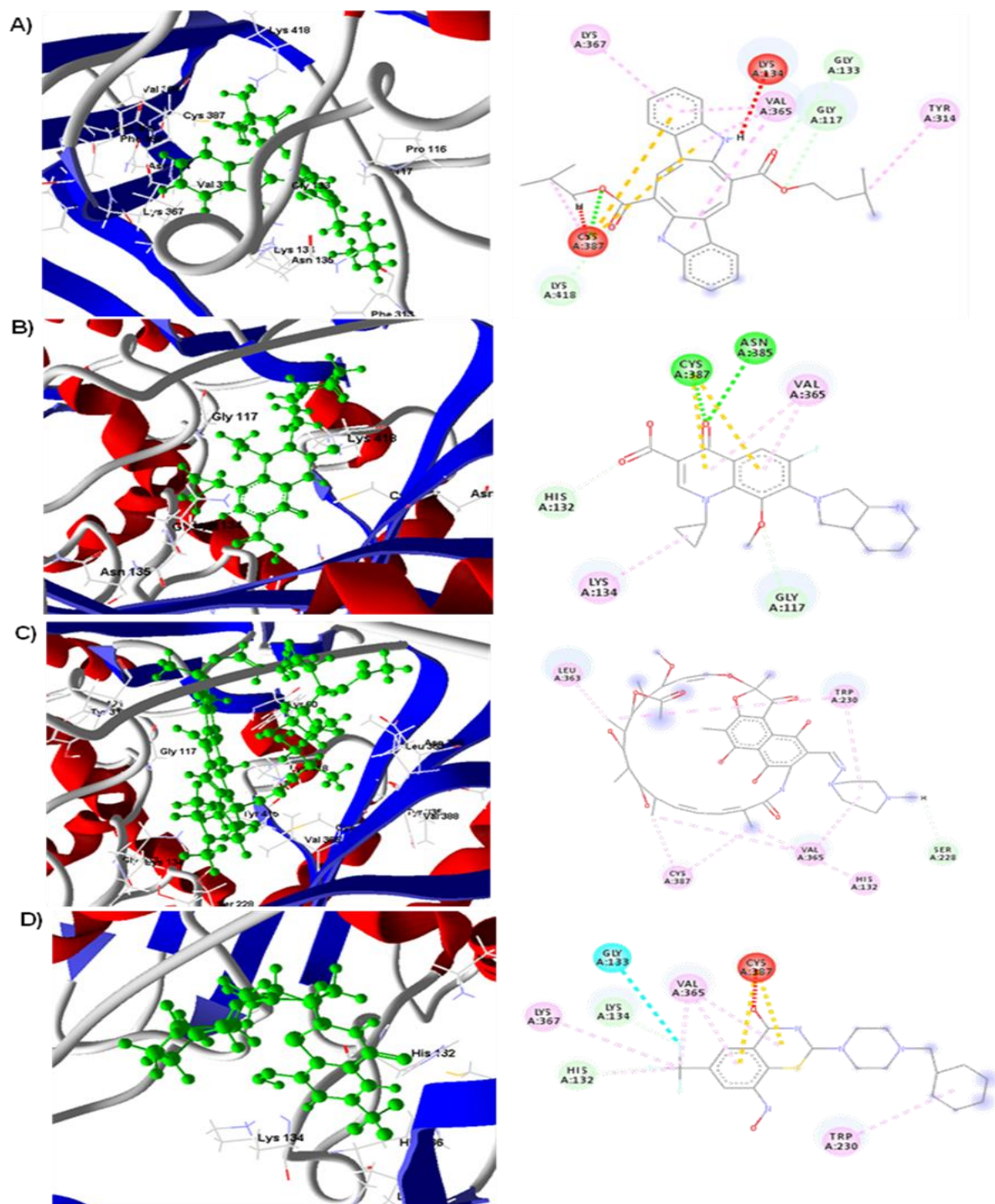


Figura 8: Interações 2D e 3D entre o composto Caulerpina diisobutyl (A), o Moxifloxacino (B), a Rifampicina (C), o ligante PDB 2-(4-(ciclohexilmetil) piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-benzo[e][1,3]tiazin-4-ona (D) e a macromolécula Decaprenilfosforil-beta-D-ribose 2-epimerase (DpE1) (PDB: 4NCR). Interações: interações hidrofóbicas estão destacadas em rosa, as interações de hidrogênio estão destacadas em verde e as interações estéricas estão destacadas em laranja e em vermelho. Resíduos: Lys (Lisina), Val (Valina), Gly (Glicina), Tyr (Tirosina), Cys (Cisteína), Asn (Asparagina), His (Histidina), Leu (Leucina), Trp (Triptofano), Ser (Serina).

5.1.4 Avaliação da interação molecular entre o composto Caulerpina Diisobutil, os inibidores Moxifloxacino e Rifampicina, o ligante PDB ácido [5-metoxi-2-([4-(trifluorometil)fenil]sulfonil)carbamoil]-1H-indol-1-il]acético e a macromolécula Pantotenato sintase (PDB: 4MUE).

A macromolécula Pantotenato sintase (PDB: 4MUE), a qual representa uma enzima vital para a estrutura do *Mycobacterium tuberculosis*, visto que, catalisa a formação dependente de ATP de uma ligação amida entre o pantoato e a β -alanina, sendo dessa forma essencial para a sobrevivência deste microorganismo (HUNG et al, 2016). Nesse alvo, o composto Caulerpina diisobutil apresentou score de energia menor que os fármacos controles Moxifloxacino e Rifampicina, como também o ligante PDB ácido [5-metoxi-2-([4-(trifluorometil)fenil]sulfonil)carbamoil]-1H-indol-1-il]acético no algoritmo MolDock Score, correspondendo a $-167.091 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, enquanto que os inibidores Moxifloxacino e Rifampicina apresentaram score correspondente a $-105.491 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e $-153.738 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. Já o ligante PDB ácido [5-metoxi-2-([4-(trifluorometil)fenil]sulfonil)carbamoil]-1H-indol-1-il]acético demonstrou valores de $-137.379 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. O encaixe molecular ocorrido entre os compostos Caulerpina-diisobutil, os fármacos controle Moxifloxacino e Rifampicina, o ligante PDB ácido [5-metoxi-2-([4-(trifluorometil)fenil]sulfonil)carbamoil]-1H-indol-1-il]acético e o alvo Pantotenato sintase (PDB: 4MUE) é observado na figura 9.

Observou-se que as interações do composto Caulerpina diisobutil são do tipo ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde), sendo estas estabelecidas com os átomos do grupo éster por meio dos resíduos Lys 160 (1 interação), Asp 161 (1 interação), Ser 197 (2 interações) e Ser 196 (1 interação). As interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) foram observadas nos átomos de Carbono (C) da estrutura química do composto através dos aminoácidos Lys 160 (2 interações), Met 195 (1 interação), Val 187 (1 interação), Phe 157 (1 interação), Leu 165 (1 interação), His 47 (1 interação) e Met 40 (1 interação). A interação estérica (linha tracejada em vermelho) foi observada apenas nos átomos de Hidrogênio (H) das metilas (CH_3) do grupo diisobutil. O resíduo responsável por essa interação correspondeu a Gly 158 (1 interação). Vale salientar que os resíduos Met 40 e Phe 157 são resíduos importantes na constituição da bolsa hidrofóbica do sítio da enzima Pantotenato sintase (PDB: 4MUE).

O fármaco controle Moxifloxacino apresentou apenas interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e interações do tipo ligação de hidrogênio (linhas tracejadas em

verde). As interações hidrofóbicas foram observadas nos átomos de Carbono (C) dos anéis através dos aminoácidos Met 40 (2 interações), Leu 50 (1 interação), His 47 (2 interações), His 44 (2 interações) e Lys 160 (1 interação). As ligações de hidrogênio foram observadas nos átomos de grupo carboxila por meio dos resíduos Val 187 (2 interações), Thr 186 (1 interação) e Gly 46 (1 interação); nos átomos de Hidrogênio (H) do grupo metoxila (OCH₃) através do resíduo Asp 161 (2 interações) e nos átomos de Hidrogênio dos anéis aromáticos por meio dos aminoácidos Met 195 (1 interação) e Pro 38 (1 interação). Foram observadas interações semelhantes entre o composto Caulerpina-diisobutil e o fármaco Moxifloxacino referente as ligações de hidrogênio estabelecida pelo resíduo Asp 161, como também referentes as interações hidrofóbicas dos aminoácidos Lys 160, His 47 e Met 40.

O fármaco controle Rifampicina estabeleceu ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) com os átomos de Hidrogênio (H) do grupamento amina por meio dos resíduos Asp 161 (1 interação) e His 135 (1 interação), aos átomos de Hidrogênio (H) do grupo hidroxila (OH) por meio dos resíduos His 47 (1 interação) e His 44 (1 interação), aos átomos de Oxigênio (O) dos grupos carbonila pelos resíduos Glu 159 (1 interação), Thr 181 (1 interação), Phe 160 (2 interações) e ao átomo de Oxigênio do grupamento éter por meio do resíduo Ser 196 (1 interação). O último tipo de interação visualizado correspondeu as interações estéricas (linhas tracejadas em vermelho) por meio dos átomos de hidrogênio dos grupos (CH e CH₃) através dos resíduos Pro 38 (2 interações), Leu 50 (1 interação), Ser 197 (2 interações), Gln 164 (1 interação); os átomos de Hidrogênio (H) do grupo amina (NH) por meio dos resíduos Gln 164 (1 interações), Phe 165 (1 interação); nos átomos de Hidrogênio (H) dos grupos hidroxila (OH) por meio Gln 164 (1 interação), His 44 (1 interação) e Leu 50 (1 interação). Foram observadas interações semelhantes entre o fármaco Rifampicina e o composto Caulerpina-disobutil que compreenderam as ligações de hidrogênio através dos resíduos Asp 161 e Ser 196 e as interações hidrofóbicas por meio dos resíduos Phe 157, His 47 e Met 40.

O ligante PDB ácido [5-metoxi-2-([4-(trifluorometil)fenil]sulfonil)carbamoil]-1H-indol-1-il]acético apresentou interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) nos átomos de Carbono (C) dos anéis aromáticos, do grupo metóxi (OCH₃) e do grupo (CF₃) por meio dos resíduos Val 143 (1 interação), Phe 157 (1 interação), Val 184 (1 interação), Leu 50 (1 interação), Ala 49 (1 interação), Val 187 (1 interação), His 44 (2 interações), Met 40 (1 interação) e Lys 160 (1 interação). As interações estéricas ocorreram em menor número sendo visualizada no grupo carboxila por meio do resíduo Lys 160, e no átomo de enxofre

(S) por meio do resíduo His 47 (1 interação). Já as ligações de hidrogênio compreenderam vários grupos sendo esses correspondentes a: átomos de Hidrogênio (H) do grupo amina (NH) por meio do resíduo His 47 (1 interação), os átomos de Oxigênio (O) dos grupos carbonila por meio do resíduo Met 40 (1 interação). Os átomos de Hidrogênio (H) dos grupos metila (CH₃) e (CH) por meio dos resíduos Pro 185 (1 interação), Gly 46 (1 interação) e Met 195 (1 interação), além dos átomos de Oxigênio (O) dos grupos metóxi por meio dos resíduos Thr 186 (1 interação) e Val 187 (1 interação). Foram observadas interações semelhantes entre o composto Caulerpina-disobutil e ligante PDB ácido [5-metoxi-2-({[4-(trifluorometil)fenil]sulfonil}carbamoil)-1Hindol1il]acético que compreenderam as interações hidrofóbicas dos resíduos Lys 160, Val 187, Phe 157 e Met 40.

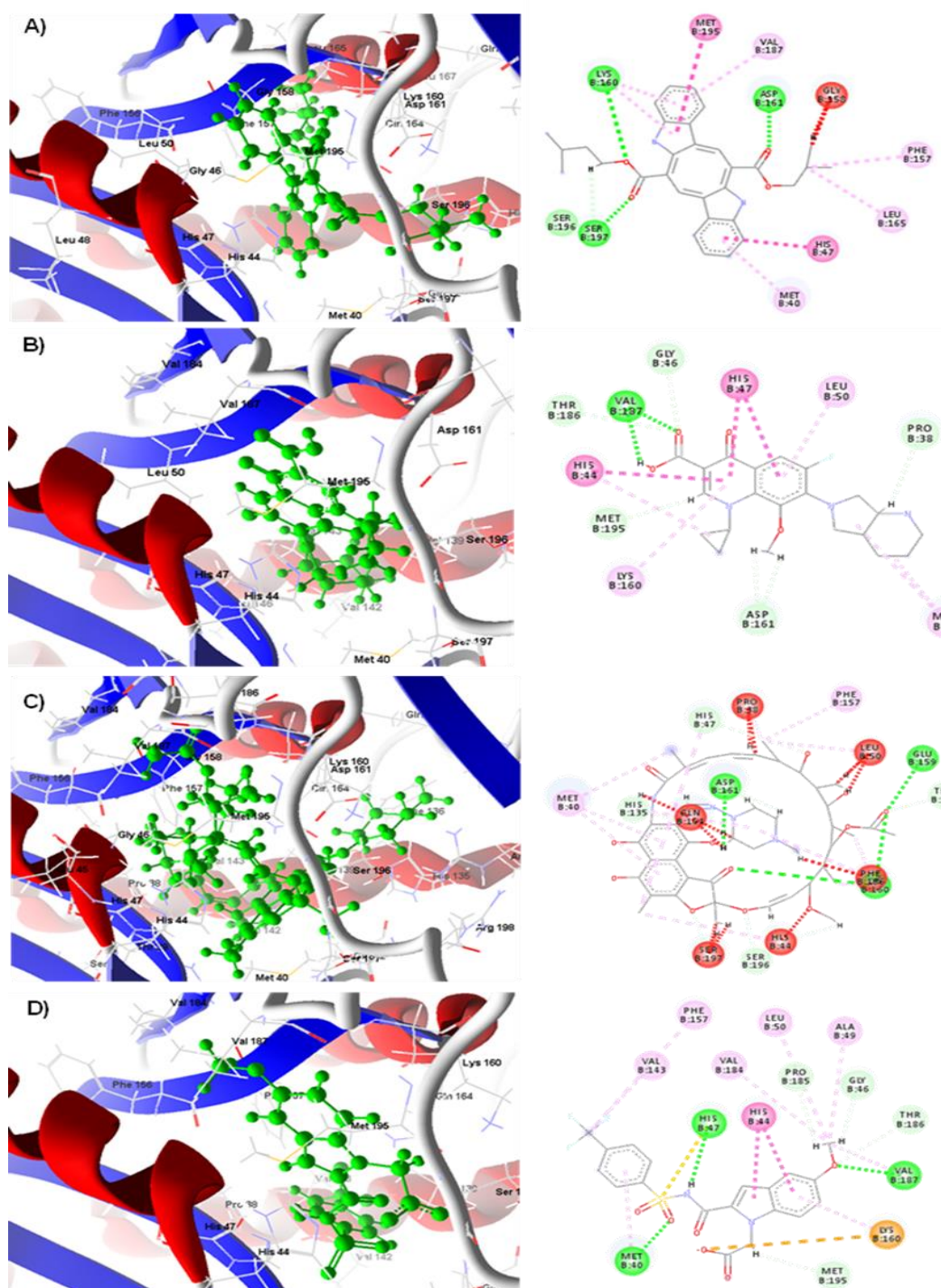


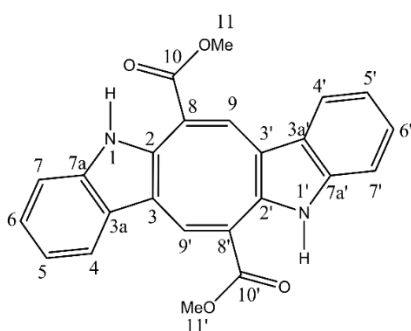
Figura 9: Interações 2D e 3D entre o composto Caulerpina diisobutil (A), o Moxifloxacino (B), a Rifampicina (C), o ligante PDB ácido [5-metoxi-2-((4-(trifluorometil)fenil)sulfonil)carbamoil]-1H-indol-1-il]acético (D) e a macromolécula Pantotenato sintetase (PDB: 4MUE). Interações: interações hidrofóbicas estão destacadas em rosa, as interações de hidrogênio estão destacadas em verde e as interações estéricas estão destacadas em laranja e em vermelho. Resíduos: Met (Metionina), Val (Valina), Asp (Ácido aspártico), Gly (Glicina), Phe (Fenilalanina), Leu (Leucina), His (Histidina), Ser (Serina), Lys (Lisina), Pro (Prolina), Thr (Treonina), Glu (Ácido glutâmico), Gln (Glutamina) e Ala (Alanina).

5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

5.2.1 Identificação estrutural da Caulerpina

A Caulerpina foi isolada do extrato da alga verde *C. racemosa* com rendimento correspondente a 5% do extrato bruto. A elucidação da estrutura do produto natural foi baseada principalmente na análise de seus espectros IR, RMN ¹H e ¹³C, e em comparação com dados da literatura. O espectro IR revelou bandas em $\nu_{\max}$ 3382 (N-H), 2925 e 2852 (C-H sp³), 1265 (C-O), 1687 (referente a estiramento C=O de éster conjugado a C=C) e 1616, 1591 e 743 cm⁻¹ (C-H do anel benzeno). Dados espectrais de RMN ¹H (Tabela 6) apresentaram quatro sinais característicos de benzeno orto- dissustituído: dois dubletos largos (δ 7.43, 1H e δ 7.30, 1H) e dois duplos tripletos (δ 7.20, 1H e δ 7.11, 1H). O singlete observado em δ 9,21 sugere a presença de nitrogênio de núcleo indólico, característico da classe dos alcaloides, e a presença de dois singletos em δ 8.06 e δ 3.90 sugerem a presença de grupo metínico de unidade ciclooctatetraeno e metoxila, respectivamente. Dados de RMN ¹³C-APT (Tabela 6) confirmam a presença do anel benzeno (δ_c 111.66 e 123.51), além do grupo metoxila (δ_c 52.68) e da carbonila de éster (δ_c 166.80). Diante dos resultados obtidos foi possível identificar o composto obtido do extrato de *C. racemosa* como o alcaloide majoritário caulerpina (Figura 10) já isolada anteriormente em várias espécies de *Caulerpa* (Lorenzo, 2010).

Figura10: Estrutura do alcaloide bis-indólico, Caulerpina



(Estrutura 1)

Tabela 6: Dados comparativos de RMN 1H e 13C da Caulerpina (1) (δ , CDCl₃, 200 MHz) com dados da literatura (δ , CDCl₃, 150 MHz).

Carbo nos	Composto analisado		Caulerpina (1) (Lorenzo, 2010)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
N	9.10 (s, 1H)	---	9.20 (s, 1H)	---
2/2'	--	133. 0	---	132.8
3/3'	--	112. 0	---	112.4
3a/3a'	--	128. 3	---	128.1
4/4'	7.3 (dl,1H)	118. 4	7.41(dl, 1H)	118.0
5/5'	7.05 (dt, 1H)	120. 8	7.07 (dt, 1H)	120.7
6/6'	7.20 (dt, 1H)	123. 5	7.17 (dt, 1H)	123.3
7/7'	7.31 (dl, 1H)	111. 7	7.29 (dl, 1H)	111.5
7a/7a'	---	137. 8	---	137.7
8/8'	---	125. 6	---	125.6
9/9'	8.06 (s, 1H)	142. 9	8.04 (s, 1H)	142.9
10/10'	---	166. 8	---	166.6
11/11'	3.90 (s, 3H)	52.7	3.88 (s, 1H)	52.6

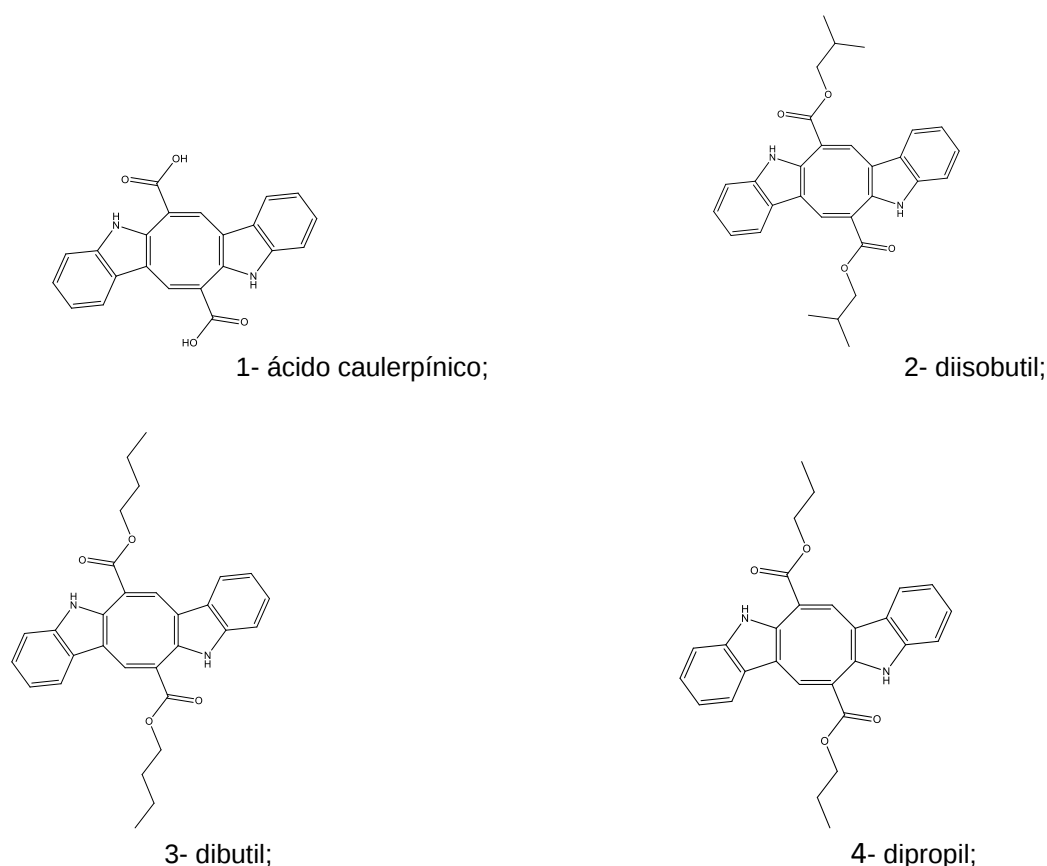
Fonte: Lorenzo, 2010.

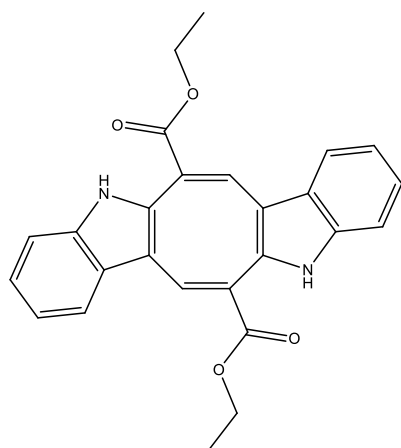
5.3 AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL *IN SILICO*: MOLINSPIRATION

Abordagens experimentais e computacionais para estimar a solubilidade e permeabilidade em configurações de descoberta e desenvolvimento são descritas através do método Lipinski (LIPINSKI et al., 2001). A investigação deste pesquisador e colaboradores deu origem a chamada “regra dos 5”, que traçou um perfil para moléculas de fármacos dentro de limites de massa molar, lipofilia que é representada pelo coeficiente de partição, log P, e hidrofilia, representada pelo número de doadores e receptores de ligação de hidrogênio. A “regra dos cinco” estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral (SILVA, 2015).

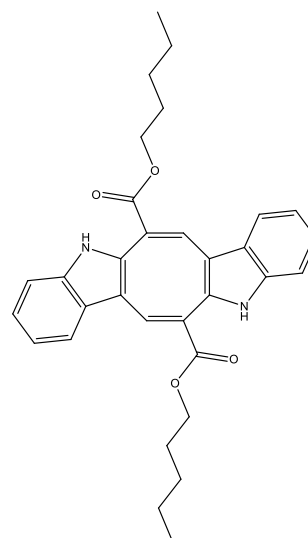
A partir da metodologia empregada, observou-se os resultados de biodisponibilidade oral seguindo a regra dos cinco Lipinski. Foram obtidas nove substâncias-teste através do site gratuito Pubchem® (Figura 11).

Figura11: Estrutura química dos derivados da Caulerpina

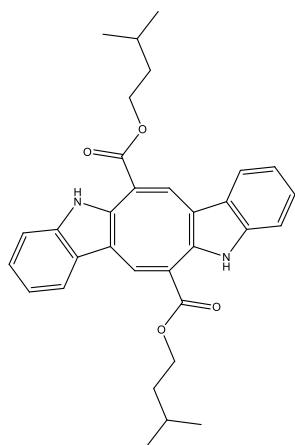




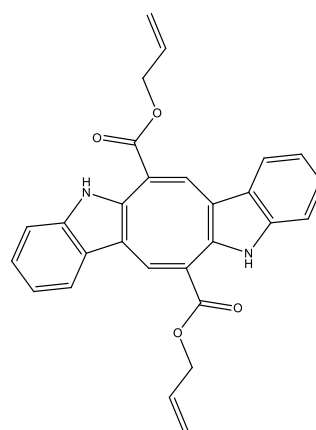
5- dietil;



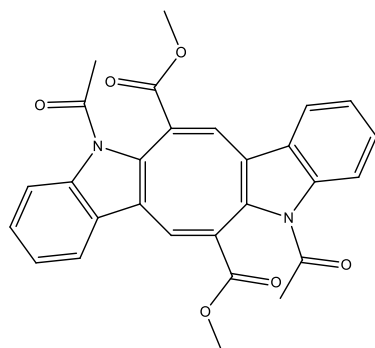
6- dipentil;



7-diisopentil;



8- dialil;



9- dimetil.

Tabela 7: Análise *in silico* da biodisponibilidade oral de acordo com a regra dos 5 Lipinski.

	PROPRIEDADES MOLECULARES								
	miLog	TPSA	Natom	MW	nON	N OHNH	nV	nrothb	vol
1- dicarboxylic acid;	4.58	106.18	28	370.36	6	4	0	2	311.40
2- diisobutyl;	7.35	84.19	36	482.58	6	2	1	8	446.84
3- dibutyl;	7.98	84.19	36	482.58	6	2	1	10	447.27
4- dipropyl;	6.86	84.19	34	454.53	6	2	1	8	413.66
5- diethyl;	5.86	84.19	32	426.47	6	2	1	6	380.06
6- dipentyl;	8.89	84.19	38	510.53	6	2	2	12	480.87
7-diisopentyl;	8.34	84.49	38	510.63	6	2	2	10	480.44
8- diallyl;	6.39	84.19	34	450.49	6	2	1	8	402.40
9- dimethyl.	5.75	96.62	36	482.49	8	0	1	4	418.31

Sigla. milLogp: coeficiente de partição octamol água (≥ 5); TPSA: área de superfície polar total ($\leq 140\text{\AA}$); Natom: número de átomos; MW: peso molecular ($\leq 500\text{g/mol}$); nON: número de aceptores de hidrogênio (≤ 10); nOHNH: número de doadores de hidrogênio (≤ 5); nV: número de violações; nROTB: número de rotações; vol: volume. FONTE: Pubchem® (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>); Molinspiration Cheminformatics(<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>)

Dentre as substâncias analisadas, a 1 (ácido caulerpínico) apresentou-se dentro de todos os padrões exigidos pela “regra dos 5” (tabela 7). Os valores dos seus resultados demonstraram uma grande vantagem para o avanço dos estudos, pois esta apresentou boas características de biodisponibilidade teórica, mostrando-se, portanto, como uma molécula promissora para futura formulação de novos fármacos.

Avaliando o quesito do coeficiente de partição, que determina o grau de lipofilia de uma droga, todas as demais substâncias estudadas apresentaram alteração desse valor, no entanto, as substâncias 2 (diisobutil), 3 (dibutil), 4 (dipropil), 5 (dietil), 8 (dialil) e 9 (dimetil) violaram apenas esse quesito na “regra dos 5” de Lipinski, ou seja, constatou-se apenas uma violação quando das propriedades moleculares, portanto, também se enquadraram como promissoras (tabela 7).

Medeiros et al. (2020), utilizaram o software Molinspiration para o cálculo de importantes propriedades físico-químicas da molécula, bem como para avaliar a probabilidade do composto atuar em diferentes alvos farmacológicos gerando uma noção de suas características farmacodinâmicas. A previsão do escore de bioatividade pelo software também foi realizada na pesquisa de Ammal et al. (2020), evidenciando que a triagem biológica *in silico* indicou que os compostos estudados eram bons candidatos a fármacos, possuindo diversas atividades biológicas. Os referidos autores, realizaram uma triagem fitoquímica e estudos *in silico*, incluindo a aplicação do software Molinspiration de flavonóides, tendo em vista a recente explosão de interesse na bioatividade desses flavonóides de microalgas e seus benefícios à saúde.

Para Benet et al. (2016), a metodologia da “regra de 5” não parece ser tão útil hoje na definição de medicamentos como quando foi proposta. Os autores observaram critérios adicionais necessários e encontraram deficiências significativas nos quatro critérios da “regra de 5” originalmente propostos por Lipinski e colaboradores. Dessa forma, os referidos autores, sugeriram a associação BDDCS (Sistema de Classificação de Disposição de Drogas Biofarmacêuticas)/Regra de cinco como uma forma ampliar as possibilidades de previsões teóricas.

Santos et al. (2021) utilizaram uma série de chalconas e seus análogos B-aril que foram preparados e avaliados como inibidores de atividade de cloração da mieloperoxidase (MPO). Eles verificaram que as substâncias estudadas respeitaram os

limites físico-químicos delineados por Lipinski, fatores importantes para alcançar a farmacocinética do composto desejável indicando, portanto, que eles podiam não ter restrições na biodisponibilidade oral com base nesses limites.

Estudos recentes de Souza et al. (2021) também utilizaram a metodologia *in silico* baseando-se na regra de cinco Lipinski. Os derivados de α -aril- α -tetralonas e α -fluoro- α -aril- α -tetralonas foram sintetizados por reação de α -arilação catalisada por paládio de α -tetralonas e α -fluoro- α -tetralonas, com bromoarenos em rendimentos moderados a bons. Estes compostos foram avaliados por seus efeitos antiproliferativos *in vitro* contra câncer de mama humano e linhagens de leucemia com diversos perfis de resistência a drogas. Os resultados *in silico* refletiram nos baixos efeitos em células não tumorais. Eissa et al (2021) verificaram, através de estudos computacionais, que derivados tiazólicos demonstraram nenhuma violação para a regra de Lipinski, sendo, portanto, compostos biodisponíveis por via oral e com alta absorção gastrointestinal.

A massa molecular, que deve apresentar valores iguais ou abaixo de 500g/mol, apresentou-se alterada nas moléculas 6 (dipentil) e 7 (diisopentil) (tabela 7). Tais moléculas também apresentaram seus valores de coeficiente de partição alterados, portanto, violaram dois quesitos da “regra dos 5”, ou seja, não apresentaram boa disponibilidade teórica.

Bergström, Charman e Christopher (2016), afirmaram que muitos candidatos a fármacos contemporâneos apresentam propriedades físico-químicas que estão se movendo em direção a um peso molecular mais alto e, coincidentemente, também a uma maior lipofilicidade na busca por seletividade e especificidade biológica resultando, geralmente, em uma menor solubilidade em água. Os estudos *in silico* permitem portanto, uma estratégia de formulação para diferentes fármacos administrados por via oral. Bergström e Christopher (2016) enfatizaram a importância da interação entre as propriedades da droga, a formulação e o ambiente gastrointestinal na determinação da absorção oral, parâmetros que se movem além da “regra dos 5”. Cordeiro e Kachroo (2020) pesquisaram análogos do tiazol, devido a necessidade de descoberta de fármacos mais seguros e econômicas para tuberculose. Todos os compostos sintetizados foram também avaliados usando o software Molinspiration, cumprindo todos os parâmetros exigidos da “regra de cinco” de Lipinski, comprovando que aqueles análogos apresentaram bons potenciais antituberculose. Abordagens computacionais combinadas

com investigações experimentais também podem ser utilizadas para projetar fabricação de drogas, melhorando o controle de qualidade (BOETKER et al., 2016).

Abordagens experimentais e computacionais são utilizadas para estimar a solubilidade e permeabilidade em configurações de descoberta e desenvolvimento. No ambiente de desenvolvimento, os cálculos de solubilidade que se concentram na previsão do valor exato são difíceis por causa do polimorfismo. Trabalhos recentes sobre relações lineares de energia livre e abordagens Log P são revisados criticamente. Predições úteis são possíveis em séries analógicas estreitamente relacionadas quando combinadas com medições experimentais de solubilidade termodinâmica (LIPINSKI et al., 2001).

5.4 AdmetSAR

As nove substâncias selecionadas através do site gratuito Pubchem® (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) foram submetidas ao estudo *in silico* para avaliação dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) usando o endereço: (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>) (Tabela 8).

Tabela 8: Propriedades de classificação de ADMET, calculadas no software admetSAR

Substâncias									
Resultados e probabilidades									
Absorção	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Barreira hematoen-Cefálica	+0.8792	+0.8333	+0.8512	+0.8402	+0.8268	+0.8884	+0.8168	+0.9381	+0.9632
Absorção intestinal humana	+0,9368	+0,989	+0,991	+0,9899	+0,9913	+0,9896	+0,9822	+0,9659	+0,9560
Permeabilidade em Caco-2	-0,7501	-0,6051	-0,6179	-0,6448	-0,6399	-0,6302	-0,6003	-0,6230	+0,6011
Substrato da glicoproteína P	não 0,6942	não 0,5134	substr 0,5898	substr 0,5197	não 0,5189	substr 0,6549	substr 0,5767	não 0,6008	não 0,7936
Inibidor da glicoproteína P	não 0.9691	não 0.5874	não 0.7208	não 0.6981	não 0.7852	não 0.7164	não 0.5721	não 0.7568	não 0.5495
	não 0.9218	inib 0.5895	não 0.8647	não 0.8320	não 0.8263	não 0.7946	não 0.5729	não 0.5665	inib 0.5978
Transporte renal de cátions orgânicos	não 0.9037	não 0.8400	não 0.7787	não 0.7997	não 0.8327	não 0.7704	não 0.7671	não 0.7544	não 0.8720

Continua

Distribuição	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Localização Celular: Mitocôndrias	0.7014	0.8351	0.7877	0.8398	0.8358	0.7679	0.8459	0.7653	0.7639
Metabolismo									
Substrato CYP450 2C9	não 0.7882	não 0.8269	não 0.8466	não 0.8573	não 0.8547	não 0.8573	Não 0.8141	não 0.8596	não 0.7688
Substrato CYP450 2D6	não 0.8476	não 0.836	não 0.8029	não 0.8195	não 0.8465	não 0.8079	Não 0.7981	não 0.8366	não 0.8076
Substrato CYP450 3A4	não 0.7890	não 0.577	não 0.6100	não 0.6126	não 0.6841	não 0.5788	Não 0.5122	não 0.7265	substr. 0.5510
Inibidor CYP450 1A2	inibidor 0.5918	inibidor 0.774	inibidor 0.8240	inibidor 0.8357	inibidor 0.9012	inibidor 0.7630	inibidor 0.7071	inibidor 0.7687	inibidor 0.5551
Inibidor CYP450 2C9	não 0.7604	inibidor 0.6167	inibidor 0.7185	inibidor 0.7419	inibidor 0.6537	inibidor 0.6560	inibidor 0.5827	inibidor 0.6587	inibidor 0.5313
Inibidor CYP450 2D6	não 0.9234	não 0.7415	não 0.8405	não 0.8231	não 0.7145	não 0.8004	Não 0.8499	não 0.7254	não 0.8767
Inibidor CYP450 2C19	não 0.8210	inibidor 0.6327	inibidor 0.6487	inibidor 0.6754	inibidor 0.6533	inibidor 0.6573	inibidor 0.5532	inibidor 0.6923	inibidor 0.6381
Inibidor CYP450 3A4	não 0.8009	inibidor 0.5415	inibidor 0.5827	inibidor 0.5429	inibidor 0.6416	inibidor 0.5335	Não 0.5480	inibidor 0.5480	inibidor 0.6379
Promiscuidade inibitória CYP	Baixa 0.9102	Alta 0.7302	Alta 0.6792	Alta 0.7491	Alta 0.8265	Alta 0.7255	Alta 0.5261	Alta 0.8210	Alta 0.6472

Continua

Toxicidade	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HERG	fraco 0.9897	fraco 0.9871	fraco 0.9707	fraco 0.9632	fraco 0.9839	fraco 0.9626	Fraco 0.9738	fraco 0.9706	fraco 0.9953
Inibição Genética	não 0.9014	não 0.7928	não 0.7799	não 0.7619	não 0.7865	não 0.5880	Não 0.7958	não 0.8484	não 0.8071
Toxicidade Ames	não 0.9322	não 0.7263	não 0.8034	não 0.8204	não 0.7508	não 0.8157	Não 0.7751	não 0.7185	não 0.6064
Carcinógeno	não 0.9031	não 0.8501	não 0.9120	não 0.9027	não 0.8276	não 0.9114	não 0.9125	não 0.8883	não 0.8438
Toxicidade em peixes	alta 0.9563	alta 0.9969	alta 0.9929	alta 0.9806	alta 0.9872	alta 0.9955	alta 0.9966	alta 0.9990	alta 0.8636
Toxicidade em Tetrahymena Pyriformis	alta 0.5462	alta 0.9583	alta 0.9918	alta 0.9919	alta 0.9555	alta 0.9940	alta 0.9933	alta 0.9889	alta 0.6862
Toxicidade da abelha do mel	baixa 0.6532	baixa 0.5410	baixa 0.6268	baixa 0.6339	baixa 0.5751	baixa 0.6423	baixa 0.5881	baixa 0.5466	baixa 0.6280
Biodegradação	não 0.9081	não 0.9827	não 0.9648	não 0.9603	não 0.9697	não 0.9798	não 0.9813	não 0.9825	não 0.8259
Toxicidade aguda oral	III 0.4484	III 0.6679	III 0.7039	III 0.7042	III 0.7071	III 0.7342	III 0.6954	III 0.6675	III 0.5652

Derivados da CLP: 1-dicarboxylic acid; 2-diisobutyl; 3-dibutyl; 4-dipropyl; 5-diethyl; 6-dipentyl; 7-diisopentyl; 8- diallyl; 9- dimethyl.

Tabela 9: Propriedades de regressão ADMET, calculadas no software admetSAR

Substâncias									
Valores									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Absorção									
Solubilidade aquosa (Logs)	-4.1684	-4.7364	-4.5081	-4.2402	-4.2347	-4.6402	-4.6778	-4.3390	-3.9410
Permeabilidade em Caco-2 (LogPapp cm/s)	0.0818	0.700	0.5702	0.5329	0.4541	0.4466	0.7136	0.4275	1.0611
Toxicidade									
Toxicidade aguda em ratos (LD50 Mol/kg)	2.2055	2.2607	2.2956	2.2302	2.2353	2.2808	2.2849	2.2494	2.4938
	1.2264	0.3468	0.4645	0.5661	0.7824	0.5957	0.2894	0.0179	0.5409
Toxicidade em peixes pLC50 mg/L)									
Toxicidade em Tetrahymena Pyriformis pIgC50 ug/L	0.2862	0.9583	1.0301	0.9794	0.7810	1.1088	1.1047	0.9856	0.5816

Derivados da CLP: 1-dicarboxylic acid; 2-diisobutyl; 3-dibutyl; 4-dipropyl; 5-diethyl; 6-dipentyl; 7-diisopentyl; 8- diallyl; 9- dimethyl.

Diante dos resultados obtidos, a absorção teórica das substâncias foi avaliada através dos parâmetros de penetração da barreira hematoencefálica (BBB), na qual todas apresentaram valores positivos, variando com probabilidade de 0,8168 (substância 7- diisopentil)) a 0,9632 (substância 9- dimetil), sugerindo uma possível inatividade no SNC, pois todos os valores foram inferiores a 1 ($C_{Brain}/C_{blood} < 1$) (GHANNAY et al., 2020) (tabela 8). Os valores da absorção intestinal humana, que prevê a absorção da droga pelo intestino, demonstraram valores altos e positivos, favorecendo assim, fármacos administrados pela via oral, dentre elas destacou-se a substância 5 (dietil), com valor de 0.9913 de probabilidade. O intestino apresenta maior área absorptiva devido suas microvilosidades, sendo mais desejável que os fármacos sejam absorvidos nesta região (DOS SANTOS et al., 2018).

Com relação à permeabilidade teórica em Caco-2, que representam as células do adenocarcinoma do cólon humano (Yee, 1997), apenas a substância 9 (dimetil) com valor de 0,6011, apresentou tal característica (tabela 8). A monocamada Caco-2 tem sido extensivamente utilizada para a triagem de alto rendimento de permeabilidade de drogas e identificação de substratos, inibidores e indutores de transportadores intestinais, especialmente glicoproteína-P. Tradicionalmente, a monocamada Caco-2 é vista como uma barreira única, em vez de uma monocamada de células polarizadas, que consiste em enzimas metabólicas que são localizadas entre duas barreiras de membrana com transportadores distintamente diferentes (SUN et al., 2008).

Hilgers et al. (1990) verificaram que as células do Caco-2, quando cultivadas em filtros semipermeáveis, se diferenciaram espontaneamente em cultura para formar monocamadas confluentes que, tanto estrutural quanto funcionalmente, se assemelhavam ao epitélio do intestino delgado, concluindo assim, que o sistema de células Caco-2 forneceu previsões úteis sobre o potencial de absorção oral de novas substâncias medicamentosas.

A análise da absorção mostrou também que substâncias 3, 4, 6 e 7 (dibutil, dipropil, dipentil e diisopentil, respectivamente) apresentaram-se como substratos da glicoproteína P, enquanto as 1, 2, 5, 8 e 9 (ácido caulerpínico, diisobutil, dietil, dialil e dimetil, respectivamente) como não-substratos. A bomba de efluxo intestinal, P-glicoproteína (P-gp), localizada nas membranas apicais das células absorptivas intestinais, pode reduzir a biodisponibilidade de uma ampla gama de drogas que são substratos para este transportador de membrana, como também substâncias

inibidoras aumentam a biodisponibilidade da molécula (VARMA et al. 2005; CONSTANTINIDES; WASON 2007). Como inibidores da glicoproteína P temos as 2 (diisobutil) e 9 (dimetil). As demais classificaram-se como não inibidoras (tabela 8). Dessa forma, a substância que apresentou melhores características foi a 2 (diisobutil), classificada como não substrato e inibidora da glicoproteína P, demonstrando bons resultados terapêuticos teóricos.

Com relação à depuração, os túbulos proximais dos rins desempenham importante função na excreção de fármacos orgânicos e seus metabólitos. O transportador de cátions orgânicos é fundamental na excreção renal de fármacos catiônicos. Existindo alterações nesses transportadores, uma toxicidade renal pode ser induzida, como também a sua inibição possibilita a ocorrência de interações medicamentosas (ALBERTONI; SCHOR, 2015; DIEKJÜRGEN; GRAINGER, 2018). Todas as nove substâncias analisadas apresentaram-se como não inibidoras do transporte renal de cátions orgânicos em teoria (tabela 8).

Após a absorção, as substâncias avaliadas apresentaram como localização celular de distribuição teórica as mitocôndrias (tabela 8). Seguindo a partir deste ponto, a maioria das drogas é metabolizada por enzimas encontradas fundamentalmente no fígado. Tal metabolização ocorre em duas fases. A fase I, que consiste nas reações de oxidação e redução, e a fase II, que são as reações de conjugação. Geralmente, o metabolismo converte compostos lipofílicos em derivados hidrofílicos, que podem ser excretados pelo corpo, geralmente pela urina (ARCO, 2005; RAUNIO et al., 2015).

Referente à metabolização, todas as substâncias apresentaram-se como não substrato do complexo citocromo (CY) P4502C9 e 2D6. Apenas a 9 (dimetil) mostrou-se como substrato do CYP 450 3A4. Todas as moléculas foram inibidoras do CYP 1A2 e apenas a substância 1 (ácido caulerpínico) mostrou-se como não inibidora do complexo citocromo P4502C9 e 2C19, o que favorece tal molécula pois substâncias inibidoras podem desenvolver efeitos colaterais e falhas terapêuticas (RAUNIO, et al., 2015). Todas foram não inibidoras do CYP450 2D6, como também inibidoras do CYP450 3A4, com exceção da substância 1 (ácido caulerpínico) e 7 (diisopentil). Apenas a substância 1 (ácido caulerpínico) demonstrou baixa promiscuidade inibitória do CYP, ou seja, não se apresenta como substrato de muitas enzimas (Tabela 8).

As enzimas do citocromo P450 são essenciais para o metabolismo e bioativação de muitos medicamentos, podendo ser inibidas ou induzidas por drogas, resultando em interações medicamentosas clinicamente significativas (LYNCH; PRICE, 2007; VASANTHANATHAN et al., 2009). Dentre as isoformas CYP2C19, 2C9, 2D6, 1A2 e 3A4, esta interage com mais da metade dos medicamentos utilizados, fato observado nas substâncias 1(ácido caulerpínico) e 7 (diisopentil), e a CYP2C9 está envolvida no metabolismo dos antiinflamatórios não esteriodais (LYNCH; PRIME, 2007; RAUNIO et al., 2015; BRAZ et al., 2018; GHANNAY et al., 2020).

As reações catalisadas por CYPs geralmente transformam os xenobióticos em metabólitos inofensivos e excretáveis, mas, às vezes, um xenobiótico inócuo é transformado em um metabólito tóxico; dessa forma, é altamente desejável ter modelos que possam prever a interação com isoformas específicas. As ferramentas *in silico* são de fundamental importância pois fornecem uma previsibilidade de dados sobre ADME e propriedades de toxicidade de compostos (LYNCH; PRIME, 2007; RAUNIO et al., 2015).

Para os parâmetros de toxicidade, foi possível constatar teoricamente que todos os compostos foram fracos inibidores do gene codificador de canais de potássio, HERG (gene relacionado com o éter-a-go-go humano), que codifica os canais de potássio e que são responsáveis pela repolarização normal de ação do músculo cardíaco (tabela 8). Mutações herdadas no gene HERG causam a síndrome do QT longo, um distúrbio que predispõe os indivíduos a arritmias potencialmente fatais. Este efeito colateral é uma razão comum para a falha do medicamento em testes de segurança pré-clínica. Modelos computacionais de predição *in silico* fornecem uma maneira rápida e econômica de rastrear compostos durante a descoberta inicial de drogas (SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006; JING et al., 2015).

A previsão *in silico* de genotoxicidade, que evoluiu muito nos últimos anos, fornece um método estabelecido e aceito que define a primeira etapa na avaliação de impurezas reativas de DNA. Isso foi possível devido à crescente quantidade de dados confiáveis de triagem de Ames, às tentativas de compreender as vias de atividade e ao subsequente desenvolvimento de sistemas de previsão baseados em computador (WICHARD, 2017).

O teste de Ames é feito através da utilização de linhagens de bactérias *Salmonella thyphimurium* para medir a mutagênicidade das moléculas, ou seja, é empregado para a análise da atividade mutagênica de compostos químicos (DOS SANTOS et al., 2018). Sendo assim, o programa AdmetSAR, previu que todas as moléculas analisadas se apresentaram como não tóxicas pelo teste de Ames, como também não carcinogênicas e não prontamente biodegradáveis, apresentando categoria de toxicidade aguda III (tabela 8).

De acordo com a avaliação dos parâmetros de toxicidade aguda em ratos nas propriedades de regressão (tabela 9), os resultados teóricos da ferramenta AdmetSAR mostraram que todas as substâncias estudadas apresentaram valores entre o intervalo de 22055 (substância 1- ácido caulerpínico) e 24938 (substância 9-dimetil), grau III de toxicidade, que inclui compostos com DL50 de valores superiores a 500 mg/kg e inferiores a 5000 mg/k, destacando-se, portanto, a substância 1 como a de menor toxicidade teórica. Também apresentaram baixa solubilidade em meio aquoso, destacando-se as substâncias 1- ácido caulerpínico (LogS de -4.1684) e 9-dimetil (LogS de -3.9410), possuindo, portanto, valores que representam um poder de absorção mais elevado (GUPTA et al., 2014).

As propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) avaliadas no estudo *in silico* desempenham papéis importantes na descoberta / desenvolvimento de novos fármacos, sendo estas informações bastante úteis ao conduzir a avaliação de risco ambiental e humano (CHENG et al., 2012).

A indústria farmacêutica atual procura desenvolver candidatos a medicamentos com menor potencial de impacto ambiental, embora tal risco tenha sido demonstrado como muito baixo. Através de técnicas analíticas modernas, resíduos de muitos produtos farmacêuticos ainda podem ser detectados no ambiente aquático. Dessa forma, uma melhor compreensão do metabolismo e da farmacocinética do fármaco pode resultar na administração de doses mais baixas para atingir o mesmo efeito terapêutico, menor duração da terapia, melhor direcionamento e melhor administração do medicamento, combinados com maior especificidade, levando diretamente a menores emissões do paciente para o meio ambiente e, portanto, menores resíduos ambientais (TAYLOR, 2015).

De acordo com Hewitt et al. (2015), uso de ferramentas *in silico* no processo de desenvolvimento de medicamentos prevê uma ampla gama de propriedades, incluindo absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade, tornando-se

cada vez mais importante devido às mudanças na legislação e aos fatores éticos e econômicos para redução dos testes em animais. Embora tais ferramentas tenham sido usadas por décadas, permanece relutância em aceitar previsões com base nesses métodos, particularmente em configurações regulatórias. Essa apreensão surge em parte devido à falta de confiança na confiabilidade, robustez e aplicabilidade dos modelos. Para resolver este problema, os autores propuseram um esquema para a verificação de modelos *in silico* que permitia avaliar a validade científica dos modelos de acordo com os princípios de boas práticas de modelagem computacional. Eles relataram a implementação do esquema no âmbito do projeto "eTOX" (toxicidade eletrônica) e sua aplicação aos modelos *in silico*.

A descoberta de medicamentos é um processo complexo e caro no qual convergem várias áreas do conhecimento. Os métodos computacionais têm contribuído, entre outras aplicações, para a análise eficiente de dados, a filtragem de coleções de compostos para selecionar moléculas para avaliação experimental, a geração de hipóteses para ajudar a compreender o mecanismo de ação de fármacos e o desenho de novas estruturas químicas. Além disso, métodos computacionais têm feito contribuições significativas para o desenvolvimento de medicamentos que estão em uso clínico (SALDÍVAR-GONZÁLEZ; PRIETO-MARTÍNEZ; MEDINA-FRANCO, 2017).

Processos *in silico* requerem não apenas um bom entendimento da mecânica de fluidos, mas também investimento em hardware, software e know-how. Na frente do hardware, colher todo o potencial do CFD requer recursos de computação de alto desempenho (HPC) e "clusters" de computação poderosos. Devido ao avanço da computação baseada em nuvem, existem inúmeras opções de baixo custo computacional em todo o mundo, mas o dilema de ponta *versus* computação em nuvem deve ser resolvido no que diz respeito às necessidades de desenvolvimento e escalas de tempo de processos correspondentes (CARDILLO et al., 2001).

5.5 RESULTADOS DOS ESTUDOS *in vitro*

5.5.1 Determinação das MIC da Caulerpina e análogos em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

As Tabelas 10 e 11 apresentam as concentrações inibitórias mínimas (MIC) das substâncias testadas frente às cepas de *M. tuberculosis* (H37Ra) para a Caulerpina e seus análogos. Os valores foram obtidos a partir da realização de três a quatro experimentos independentes, e cada substância foi testada na faixa de concentração de 1,56 μ M a 200 μ M. As concentrações maiores não foram testadas devido a solubilidade dos compostos analisados.

Dessa forma, as MICs foram determinadas usando o ensaio de redução de resazurina em microplaca (REMA), como um indicador de crescimento. Como controles positivos, foram utilizadas as moléculas antituberculosas usadas no tratamento da TB, rifampicina (RIF) e moxifloxacina (MOX). As substâncias testadas foram pesadas, tendo suas soluções preparadas em DMSO: ÁCIDO CLP, CLP DIISOBUTIL, CLP DIPENTIL, CLP DIETIL e CLP DIPROPIL, em um primeiro ensaio. Em seguida, seguindo a mesma metodologia, foram avaliadas: CLP DIPROPIL, CLP DIISOBUTIL, CLP DIETIL em um segundo ensaio. Foram preparadas soluções de trabalho usando caldo 7H9 Middlebrook para atingir as respectivas concentrações apresentadas, em seguida, diluições em série foram realizadas em microplacas de 96 poços de poliestireno com fundo U. A concentração de DMSO foi mantida a 2,5 % em todos os poços do ensaio. Após adição das cepas bacterianas aos poços, procedeu-se com a incubação das microplacas à temperatura de 37 °C, durante 7 dias para a *M. tuberculosis*. Após esta etapa, 30 μ L de uma solução de resazurina (0,02 %) foi adicionado a cada poço, e os resultados obtidos foram avaliados após 48 horas. A MIC de cada molécula avaliada foi considerada como a menor concentração de fármaco que impede uma mudança de cor de azul (resazurina) para rosa (resorufina) (MURADÁS et al., 2018).

Tabela 10: Valores da CIM para a CLP e seus derivados contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Molécula	MIC(μ M)
CLP	> 200
Ácido caulerpínico	> 200
CLP diisobutil	= 125
CLP dipentil	> 200
CLP dietil	= 125

Cada substância foi testada na faixa de concentração de 1,56 microM a 200 microM, e concentrações maiores não foram testadas devido a solubilidade dos compostos testados. Foram realizados de 3 a 4 experimentos independentes. CLP dipentil (PM=512,268); ácido caulerpínico (PM= 370,10); CLP diisobutil (PM=482,22); CLP (PM=398,4); CLP dietil (PM=426,16); CLP dipropil (PM=454,19)

Tabela 11: Valores da CIM para a CLP e seus derivados contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Molécula	MIC(μ M)
CLP dipropil	=150
CLP diisobutil	=125
CLP dietil	=175

Cada substância foi testada na faixa de concentração de 1,56 microM a 200 microM, e concentrações maiores não foram testadas devido a solubilidade dos compostos testados. Foram realizados de 3 a 4 experimentos independentes. Dipropil (PM=454,526); Disobutyl (PM=482,5800; Dietil (PM=426,472)

A realização de testes utilizando análogos da Caulerpina para avaliação da atividade contra *M. tuberculosis* foram descritas pela primeira vez por Canché Chay et al. (2014), que utilizaram a porção indol da Caulerpina para síntese de novas moléculas, sugerindo que este núcleo poderia fazer parte do arranjo estrutural responsável pela atividade contra a referida micobactéria.

Substâncias derivadas do indol (3-aril-1*H*-indóis) também foram utilizadas, recentemente, por Etchart et al. (2021) como inibidores *in vitro* do crescimento de cepa *Mtb* H37Rv, utilizando a isoniazida como controle positivo. De acordo com os valores da concentração inibitória mínima (MIC) exibidos para os compostos testados, inferiores a 20 μ M, os resultados obtidos foram satisfatórios, pois demonstraram um efeito inibitório interessante, com atividade contra cepa sensível e cepas MDR, sem resistência cruzada.

Assim, baseando-se nesses achados, o presente estudo considerou a importância da investigação dos efeitos de substituintes posicionados na porção éster CLP em um modelo *in vitro* de susceptibilidade de micobactérias a candidatos a fármacos.

De acordo com os resultados obtidos, três substâncias demonstraram resultados relevantes, pois apresentaram concentrações inibitórias mínimas menores que 200 μ M. No primeiro ensaio, CLP diisobutil (=125 μ M), CLP dietil (=125 μ M) (tabela7) e, no segundo ensaio, CLP dipropil (=150 μ M), CLP diisobutil (=125 μ M) e CLP dietil (=175 μ M) (tabela 8), destacando-se a CLP diisobutil que, devido ao menor valor de MIC em ambos, mostrou-se como uma molécula promissora candidata a fármaco.

6.CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O estudo do docking molecular dos derivados sintéticos da CLP, com as quatro proteínas analisadas (DpE1, Pantotenato sintetase, Enoil-ACP redutase e Dihidrofolato redutase) demonstraram que os derivados sintéticos da Caulerpina obtiveram energias negativas em todas as enzimas em estudo, predizendo, dessa forma, a possibilidade de interação com todos os alvos em estudo. Além disso, o composto Caulerpina isobutil foi o de maior afinidade no alvo Pantotenato sintetase (PDB: 4MUE), apresentando menor energia de ligação (-167,091) quando comparada aos fármacos de controle positivo MOX (-105,491) e RIF (-153,738), como também foi observado que, para os quatro alvos em estudo, os derivados da Caulerpina apresentaram maior afinidade quando comparados a pelo menos um dos controles em estudo.

A avaliação *in silico* para determinação dos parâmetros da biodisponibilidade oral, como também de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) revelaram que, dentre as substâncias derivadas da *Caulerpa racemosa*, (no total de nove substâncias: ácido caulerpínico, CLP diisobutil, dibutil, dipropil, dietil, dipentil, diisopentil, dialil, dimetil), sete demonstraram promissores perfis farmacocinéticos a partir dos resultados obtidos pela ferramenta Molinspiration (ácido caulerpínico, CLP diisobutil, dibutil, dipropil, dietil, , dialil, dimetil) sendo que, apenas duas (dipentil e diisopentil), violaram os princípios que regem as regras de biodisponibilidade teórica *in silico*. Ainda, estas avaliações demonstraram que, das substâncias analisadas, a maioria apresentou um bom padrão de solubilidade, estabilidade, não sofreram um metabolismo significativo no fígado e intestino. Com relação aos parâmetros teóricos de toxicidade, nenhuma apresentou potencial mutagênico, foram fracas inibidoras do HERG e pouco tóxicas.

De acordo com a avaliação *in vitro* para determinação da susceptibilidade de micobactérias aos compostos, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), das moléculas de maior atividade em cultura de *Mtb*, destacaram-se, no primeiro ensaio, CLP diisobutil (=125 μ M), CLP dietil (=125 μ M) e, no segundo ensaio, CLP dipropil (=150 μ M), CLP diisobutil (=125 μ M) e CLP dietil (=175 μ M), considerando as que resultaram em CIMs abaixo de 200 μ M.

Os ensaios de docagem molecular demonstraram bons resultados da CLP diisobutil frente ao alvo molecular Pantotenato sintetase de *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo os parâmetros da biodisponibilidade teórica e do ADMET, esta molécula demonstrou boa atividade, destacando-se como não substrato e inibidora da glicoproteína P, ou seja, apresentou bons resultados terapêuticos teóricos. Validando as predições *in silico*, na avaliação *in vitro*, esta molécula apresentou os resultados mais promissores (CIM=125 µM).

Dessa forma, diante dos favoráveis resultados, concluiu-se que a caulerpina diisobutil demonstrou ser uma promissora molécula a ser testada em futuros testes *in vitro* e *in vivo* com vistas a desenvolver novas terapias para tratar a infecção causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

REFERÊNCIAS

- ABAD, M.J.; BERNEJO, P. Bioactive natural products from marine sources. Stud. in **Nat. Prod. Chemistry**, v. 25, p. 683-755, 2001.
- ABRANTES, J.L.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, D.; PEREIRA, R.C.; FONTES, C.L.F.; TEIXEIRA, V.L.; SOUZA, T.L.M.; PAIXÃO, I.C. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota paffii* and *Dictyota menstrualis* against the Herpes simplex type-1 replicative cycle. **Planta Med.**, v.76, p.339-344, 2010.
- ACEVEDO, C. A. H. Estudos quimiotaxonômicos e triagem virtual de sesquiterpenos lactonizados isolados da família asteraceae com potencial atividade leishmanicida e tripanocida. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.
- ACHARYA, C. et al. Recent Advances in Ligand-Based Drug Design: Relevance and Utility of the Conformationally Sampled Pharmacophore Approach. **Current Computer Aided Drug Design**, v. 7, n. 1, p. 10–22, 1 mar. 2011.
- AdmetSaR. Disponível em: <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>. Acesso em: março/2021.
- AGUILLAR-SANTOS, G. Caulerpin, a New Red Pigment from Green Algae of the Genus *Caulerpa*. **J. Chem. Soc. (C)**, p. 842-843, 1970.
- ALBERTONI, G.; SCHOR, N. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease--mini-review. **J. Bras. Nef.**, v.37, p.106-114, 2015.
- ALLIANCE, TB (org.). PRETOMANID: sponsor briefing document. ANTIMICROBIAL DRUGS ADVISORY COMMITTEE MEETING. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/127593/download>. Acesso em: 27 nov. 2022.

AMMAL P.R.; PRASAD, A. R.; JOSEPH, A. Synthesis, characterization, in silico, and in vitro biological screening of coordination compounds with 1,2,4-triazine based biocompatible ligands and selected 3d-metal ions. **Heliyon**, v.6, p. e05144, 2020.

AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347-364, 1975.

AMIN, K., & DANNENFELSER, R.M Hemólise in vitro: orientação para o cientista farmacêutico. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.95, n.6, p.1173-1176, 2006.

ANJANEYULU, ASR; PRAKASH, CVS; MALLAVADHANI, UV. Dois análogos de caulerpina e um sesquiterpeno de *Caulerpa racemosa*. **Fitoquímica**, v.30, p.3041-3042, 1991.

ANTONACCI, A.; BERTALAN, I.; GIARDI, M. T.; SCOGNAMIGLIO, V.; TUREMIS, M.; FISHER, D.; JOHANNINGMEIER, U. Enhancing resistance of *Chlamydomonas reinhardtii* to oxidative stress fusing constructs of heterologous antioxidant peptides into D1 protein. **Algal Research**, v.54, p. 102184, 2021.

APPETECCHIA F, CONSALVI S, SCARPECCI C, BIAVA M, POCE G. Sar analysis of small molecules interfering with energy-metabolism in mycobacterium tuberculosis. **Pharmaceuticals**, v.3, p.1–33, 2020.

ARCO, C. Metabolismo de los fármacos. **Biblioteca Universia**, 2005.

AYYAD, S.E.; BADRIA, F.A. Caulerpine: an antitumorindele alkaloid from *caulerpa racemase*. **Alex. Journ. of Pharm. Scienc.** v.8, 217-219, 1994.

BALBOA, E. M; CONDE, E.; MOURE, A.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food Chemistry**, v.138, n.2, p. 1764-1785, 2013.

BARROS, R. P. C. Triagem virtual de metabólitos secundários com potencial atividade antimicrobiana do gênero solanum e estudo fitoquímico de solanum Capsicoides all. 2017.

BATISTA, G.; CHARLES, M.B.; MANCINI FILHO, J.; VIDAL, N. Algas marinhas como fontes de fitomedicamentos antioxidantes. **Revista Cubana de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, 2009.

BARBOSA, F.; PINTO, E.; KIJJOA, A.; PINTO, M.; SOUSA, E. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, 2020.

BENET, L. Z.; HOSEY, C. M.; URSU, O.; OPREA, T. I. BDDCS, the Rule of 5 and drugability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 101, p.89-98, 2016.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p. 43-50, 2010.

BERGSTROM C.A.S., CHARMAN WN, PORTER C.J.H. Computational prediction of formulation strategies for beyond-rule-of-5 compounds. **Bioorg. Chem.** v.101 p. 6-21, 2016.

BERGSTROM C.A.S.; PORTER C.J.H.; Understanding the Challenge of Beyond-Rule-of-5 Compounds. **Bioorg. Chem.**, v.101 p. 1-5, 2016.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV; I.N. AND BOURNE, P.E. The Protein Data Bank, **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p.235-242, 2000.

BERNSTEIN, F.C.; KOETZLE, T.F.; WILLIAMS, G.J.B.; MEYER JR, E.F.; BRICE, M.D.; RODGERS, J.R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCHI, T.; TASUMI, M. The Protein Data Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Eur. J. Biochem.**, v.80, p.319–324, 1997.

BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J.; MEYER JR, E. F.; BRICE, M. D.; RODGERS, J. R., ... & TASUMI, M. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of molecular biology**, v.112, n.3, p.535-542, 1977.

BIOVIA -Biovia Accelrys Discovery Studio 3.5. Disponível em: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>. Acesso em: 14 nov. 2022.

BITENCOURT, M. A. O.; DANTAS, G. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MIRANDA, G. E. C.; SANTOS, B. V. O.; SOUTO, J. T. Aqueous and Methanolic Extracts of *Caulerpa Mexicana* Suppress Cell Migration and Ear Edema Induced by Inflammatory agents. **Marine Drugs**, v.9, n.8, p. 1332-1345, 2011.

BITENCOURT, M. A. O.; SILVA, H. M. D.; ABÍLIO, G. M. F.; MIRANDA, G. E. C.; MOURA, A. M. A.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SILVEIRA, E. J. D.; SANTOS, B. V. O.; SOUTO, J. T. Anti-inflammatory effects of methanolic extract of green algae *Caulerpa mexicana* in a murine model of ulcerative colitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n.6, p.677-682, 2015.

BLOEMBERG, G.V.; KELLER, P.M.; STUCKI, D.; TRAUNER, A.; BORRELL, S.; LATSHANG, T.; COSCOLLA, M.; ROTHE, T.; HÖMKE, R.C.; FELDMANN, J.; et al. Acquired resistance to bedaquiline and delamanid in therapy for tuberculosis. **N. Engl. J. Med.**, v.373, p.1986–1988, 2015.

BOETKER, J.; RAIJADA, D.; AHO, J.; KHORASANI, M.; SØGAARD, S. V.; ARNFAST, L.; BOHR, A.; EDINGER, M.; WATER, J.J.; RANTANEN, J. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.11, p.492-499, 2016.

BRAZ, C. L.; FIGUEIREDO, T. P.; BARROSO, S. C. C.; REIS, A. M. M. Medicamentos com atividade sobre o citocromo P450 utilizados por idosos em domicílio. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, p.1-9, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Tuberculose na atenção primária: protocolo de enfermagem / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022b.

BREIMAN, L. Random Forest. **Machine Learning**, v. 45, p. 5–32, n. 1 2001

BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 29-63, 1995.

BRÖTZ-OESTERHELT, H.; BRUNNER, N. A.; **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.8, p.564, 2008

CAI, S.; SUN, S.; PENG, J.; KONG, X.; ZHOU, H.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D; Okaramines s–u, three new indole diketopiperazine alkaloids from *Aspergillus taichungensis* ZHN-7-07. **Tetrahedron**, v.71, p.3715, 2015.

CAMARGO, T. M.; ALVES, M. I. F.; OLIVEIRA, S. J.; SHITARA, E.S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metahemoglobina (MHb). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.39, n.2, p.95-98, 2007.

CANCHÉ CHAY, C. L.; GÓMEZ CANSINO, R.; ESPITIA PINZÓN, C. L.; TORRES OCHOA, R. O.; MARTINEZ, R. Synthesis and Anti- Tuberculosis Activity of the Marine Natural Product Caulerpin and its Analogs. **Marine Drugs**, v.12, n.4, p.1757-72, 2014.

CANTALOUBE, S. et al. The Mycobacterium tuberculosis FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29564, jan. 2011.

CARDILLO, A.G.; CASTELLANOS, M.M.; DESAILLY, B.; DESSOY, S.; MARITI, M.; PORTELA, R. M.C.; SCUTELLA, B.; VON STOSCH, M.; TOMBA, E.; VARSAKELIS, C. Towards in silico Process Modeling for Vaccines. **Trends in Biotechnology**, p.1120-1130, 2021.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007/8// 2007.

CASTRO, G.M.F.A.D. Preparação de derivados da caulerpina e avaliação dos seus efeitos citotóxicos e microbiológicos. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, 2017.

CASTRO-LÓPEZ, C.; GARCÍA, H. S.; GUADALUPE MARTÍNEZ-ÁVILA, G.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.; VALLEJO-CORDOBA, B.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Genomics-based approaches to identify and predict the health-promoting and safety activities of promising probiotic strains – A probiogenomics review. **Trends in Food Science & Technology**, v.108, p. 148-163, 2021.

CAVALCANTE-SILVA, L.H.A.; CORREIA, A.C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SILVA, B.A.; SANTOS, B.V.O.; DE LIRA, D.P.; SOUSA, J.C.F; DE MIRANDA, G.E.C.; CAVALCANTE, F.A.; MOREIRA, M.A.S. Spasmolytic Effect of Caulerpine Involves Blockade of Ca²⁺ Influx on Guinea Pig Ileum. **Mar. Drugs**, v.11, p. 1553-1564, 2013.

CAVALCANTE-SILVA, L.H.A.; CORREIA, A.C.C.; SOUSA, J.C.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SANTOS, B.V.O.; DE MIRANDA, G.E. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; CAVALCANTE, F.A. Involvement of β adrenergic receptors in spasmolytic effect of caulerpine on guinea pig ileum. **Natural Product Research**, v. 13, p. 1-6, 2016.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A., FALCÃO, M. A. P., VIEIRA, A. C. S., VIANA, M. D. M., ARAÚJO-JÚNIOR, D., XAVIER, J., ... & ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Assessment of mechanisms involved in antinociception produced by the alkaloid caulerpine. **Molecules**, v.19, n.9, p.14699-14709, 2014.

CAVALCANTI, A. B. S.; BARROS, C. R. P.; COSTA, V. C. D. O.; SILVA, S. M.; TAVARES, F. J.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. Computer-Aided Chemotaxonomy and Bioprospecting Study of Diterpenes of the Lamiaceae Family. **Molecules**, v.24, p.3908, 2019.

CER, R. Z. et al. IC50-to-Ki: A web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, 2009.

CHEMAXON. Standardizer. Disponível em: <<https://chemaxon.com/>>.

CHEMAXON Marvin Sketch- MarvinSketch 22.13. Disponível em: <https://chemaxon.com/products/marvin>. Acesso em: jan/22.

CHEMAXON Standardizer- Standardizer 22.13. Disponível em: <https://chemaxon.com/products/marvin>. Acesso em: jan/22.

CHEMDRAW - Marvin Sketch. Disponível em: <https://chemaxon.com/products/marvin>. Acesso em: jan/22.

CLC Bio Company Mollegro Virtual Docker 6.0. Disponível em: <http://molexus.io/molegro-virtual-docker/>. Acesso em: jan/22.

CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; LEE, P. W.; TANG, Y. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, p. 3099-3105, 2012.

CHOLLET, A.; MOUREY, L.; LHERBET, C.; DELBOT, A.; JULIEN, S.; BALTAS, M.; BERNADOUE, J.; PRATVIEL, G.; MAVEYRAUD, L.; BERNARDES-GÉNISSON, V. Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach. **J. Struct. Biol.**, v.190, p.328–337, 2015.

CONSTANTINIDES, P.P.; WASAN, K.M. Lipid formulation strategies for enhancing intestinal transport and absorption of P-glycoprotein (P-gp) substrate drugs: in vitro/in vivo case studies. **J Pharm Sci.** v.96, p.235-248, 2007.

COPETTI, P. M.; BISSACOTTI, B. F.; DA SILVA GÜNDEL, S.; BOTTARI, N. B.; SAGRILLO, M. R.; MACHADO, A. K.; OURIQUE, A. F.; CHITOLINA SCHETINGER, M. R.; SCHAFER DA SILVA, A. Pharmacokinetic profiles, cytotoxicity, and redox metabolism of free and nanoencapsulated curcumin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.72, p. 103352, 2022.

CORDEIRO R.; KACHROO M. Synthesis and biological evaluation of anti-tubercular activity of Schiff bases of 2-Amino thiazoles. **Bioorg. & Med. Chem. Lett.**, v.30 p. 127655, 2020.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. D. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; & EPIFANIO, R. D. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

CRICK, D.; MAHAPATRA, S.; BRENNAN, P. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. **Glycobiology**, v. 11, p. 108, 2001.

CUOMO, P.; MEDAGLIA, C.; ALLOCCA, I.; MONTONE, A.M.I.; GUERRA, F.; CABARO, S.; MOLLO, E.; ELETTO, D.; PAPAANNI, M.; CAPPARELLI, R. Caulerpin

Mitigates *Helicobacter pylori*-Induced Inflammation via Formyl Peptide Receptors. **Int. J. Mol. Sci.**, v.22, p.13154, 2021.

DA MATTA, C. B.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; ARAÚJO JÚNIOR, J. X; MIRANDA, G. E. C.; Bastos, K. X.; Sousa, J. C. F.; ... & Alexandre-Moreira, M. S. Efeito Antinociceptivo e Anti-inflamatório de *Caulerpa kempfii* (Caulerpaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 730-743, 2015.

DA MATTA, C.B.B.; SOUZA, E.T.; QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; ARAÚJO, M. V.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MIRANDA, G. E. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, B. V. O. et al. Actinociceptive and anti-inflammatory activity frm algae of the genus *Caulerpa*. **Mar. Drugs**, v.9, p.307-318, 2011.

DE AZEVEDO, J.; WALTER, F. MolDock applied to structure-based virtual screening. **Curr. Drug Targets**, v.11, p.327–334, 2010.

DEMURTAS, M., BALDISSEROTTO, A., LAMPRONTI, I., MOI, D., BALBONI, G., PACIFICO, S., ... & ONNIS, V. Derivados indol como fármacos multifuncionais: Síntese e avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e antiproliferativa de indol hidrazonas. **Bioorganic Chemical**, v.85, p.568-576, 2019.

DENYSOVA, O.; NITSCHKE, J.M. Conclusions about osmotically inactive volume and osmotic fragility from a detailed erythrocyte model. **Journal of Theoretical Biology**, v.539, p. 110982, 2022.

DESSEN, A.; QUÉMARD, A.; BLANCHARD, J. S.; JACOBS JR, W. R., & SACCHETTINI, J. C. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.267.5204, p.1638-1641, 1995.

DE SOUZA, M. V. N. et al. Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against *Mycobacterium tuberculosis*. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 720–751, jan. 2008a.

DEVOGELAERE, B.; BERKE, J. M.; VIJGEN, L.; DEHERTOGH, P.; FRANSEN, E.; CLEIREN, E.; VAN DER HELM, L.; NYANGUILE, O.; TAHRI, A.; AMSSOMS, K.; LENZ, O.; CUMMINGS, M. D.; CLAYTON, R. F.; VENDEVILLE, S.; RABOISSON, P.; SIMMEN, K. A.; FANNING, G. C.; LIN, T.-I.; TMC647055, a Potent Nonnucleoside Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor with Cross-Genotypic Coverage. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.4676, 2012.

DIEKJÜRGEN, D.; GRAINGER, D. W. Drug transporter expression profiling in a three-dimensional kidney proximal tubule in vitro nephrotoxicity model. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 470, p.1311-1323, 2018.

DIETZMANN, G. R. The marine environment as a discovery resource. **High Throughput Screening**, edited by J. P. Devlin, Marcel Dekker, New York, p. 99, 1997.

DOS SANTOS, R.C.; DANIEL, I.C.; PRÓSPERO, F.A.; DA COSTA, C.L.S. Modificação molecular incremental: análise de parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs). **Mon. Fur Chemie-Chem. Mon.** v.9, p.31-38, 2018.

DUCATI, R.G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p. 697-714, 2006.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E.; **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 33, p.201, 2009.

EISSA, S. I.; FARRAG, A. M.; ABBAS, S. Y.; EL SHEHRY, M. F.; RAGAB, A.; FAYED, E. A.; AMMAR, Y. A. Novel structural hybrids of quinoline and thiazole moieties: Synthesis and evaluation of antibacterial and antifungal activities with molecular modeling studies. **Bioorganic Chemistry**, v.110, p.104803, 2021.

EMBL-EBI. ChEMBL Data Base. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>>.

ESTEVES, P. O.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE SOUZA BARROS, C.; CIRNE-SANTOS, C. C.; LANEUVILLE, V. T. & PALMER PAIXAO, I. C. Antiviral effect of caulerpin

against chikungunya. **Natural Product Communications**, v.14, n.10, 1934578X19878295, 2019.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 73-83, 2018.

FAULKNER, D. J.; HIGHLIGHTS OF MARINE NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY (1972-1999), **Natural Product Reports**, v.17, p. 1-6, 2000.

FERNANDES, G. F. D. S. Planejamento, síntese e avaliação anti-*Mycobacterium tuberculosis* de novos derivados benzofuroxanos e nitroimidazooxazinas úteis para o tratamento da tuberculose multirresistente. 2021. Tese Doutorado - Curso de Química da Universidade Estadual Paulista, 2021.

FERNANDES, G. F. S.; JORNADA, D. H.; SOUZA, P. C.; MAN CHIN, C.; PAVAN, F. R.; SANTOS, J. L.; **Curr. Med. Chem.**, v. 22, p.3133, 2015.

FERRARIS, D.M.; MIGGIANO, R.; ROSSI, F.; RIZZI, M. *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Determinants of Infection, Survival Strategies, and Vulnerable Targets. **Pathogens**, v.7, n.17, 2018.

FERREIRA, L.G.; DOS SANTOS, R.N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v.20, n.7, p.13384-13421, 2015.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify: On the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 7, p. 1189–1204, 2010.

FRANÇA, P. H. B; BARBOSA, D. P.; SILVA, D. L.; RIBEIRO, E. A. N.; SANTANA, A. E.G.; SANTOS, B. V. O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; QUINTANS, J. S. S.; BARRETO,

R. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ARAUJO-JUNIOR, J. X.; Indole Alkaloids from Marine Sources as Potential Leads against Infectious Diseases. **BioMed Research International**, v.2014, p. 1-12, 2014.

FRANÇA, P. H. B.; SILVA-JUNIOR, E; SANTOS, B.V.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; AQUINO, T. M.; ARAUJO-JUNIOR, J. X.; Antileishmanial Marine Compounds. **Records of Natural Products**, v. 11, p. 92-113, 2017.

FREUNDLICH, J.S.; WANG, F.; VILCHÈZE, C.; GULTEN, G.; LANGLEY, R.; SCHIEHSER, GA; ... & SACCHETTINI, J.C. (2009). Derivados do triclosan: para inibidores potentes de Mycobacterium tuberculosis sensível e resistente a medicamentos. ChemMedChem: **Chemistry Enabling Drug Discovery**, v.4, n.2, p.241-248, 2009.

GHANNAY, S.; KADRI, A.; AOUADI, K. Synthesis, in vitro antimicrobial assessment, and computational investigation of pharmacokinetic and bioactivity properties of novel trifluoromethylated compounds using in silico ADME and toxicity prediction tools. **Mon. Fur Chemie-Chem. Mon.** v.151 p267-280, 2020.

GINSBURG, A. M. Tuberculosis drug development: progress, challenges, and the road ahead. **Tuberculosis** (Edinburgh, Scotland), v. 90, n. 3, p. 162–7, 2010.

GONZÁLEZ-MORAL, M. L.; PARRA, S.; GERÓNIMO-PARDO, M. In vitro assessment of the direct hemolytic effect of the volatile halogenated anesthetics sevoflurane, isoflurane, and desflurane. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.90, p.1-4, 2022.

GOVENKAR, M.B; WAHIDULLA, S. Constituents of Chondria armata. . **Phytochemistry**, v.54, p. 979-981, 2000.

GRINTER, S.; ZOU, X. Challenges, Applications, and Recent Advances of Protein-Ligand Docking in Structure-Based Drug Design. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10150–10176, 2014.

GUPTA, N.; SITWALA, N.; PATEL, K. Pharmacophore modelling, validation, 3D virtual screening, docking, design and in silico ADMET simulation study of histone deacetylase class-1 inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v.23, p.4853-4864, 2014.

GUVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, n.2, p.269-284, 2010.

HAEFNER B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discov. Today**, v. 8, p. 536-544, 2003.

HAJIAN, B.; SCOCCHERA, E.; KESHIPEDDY, S.; G-DAYANANDAN, N.; SHOEN, C.; KRUCINSKA, J.; REEVE, S.; CYNAMON, M.; ANDERSON, A.C.; WRIGHT, D.L. Propargyl-linked antifolates are potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**, v. 11, p. e0161740, 2016.

HARDEN, E.A.; FALSHAW, R.; CARNACHAN, S.M.; KERN, E.R.; PRICHARD, M.N. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against Herpes simplex virus. **Antiviral Res.** v.83, p.282-289, 2009.

HEATH, R. J.; WHITE, S. W.; ROCK, C. O. Inhibitors of fatty acid synthesis as antimicrobial chemotherapeutics. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 695–703, maio 2002.

HEWITT, M.; ELLISON, C. M.; CRONIN, M. T.D.; PASTOR, M.; STEGER-HARTMANN, T.; MUNOZ-MURIENDAS, J.; POGNAN, F.; MADDEN, J. C. Ensuring confidence in predictions: A scheme to assess the scientific validity of in silico models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.86, p.101-111, 2015.

HILGERS, A.R; CONRADI, R. A.; BURTON, P.S. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. **Pharmaceutical Research**, v. 7, p.902-910, 1990.

HUNG, A.W.; SILVESTRE, H.L.; WEN, S.; GEORGE, G.P.C.; BOLAND, J.; BLUNDELL, T.L.; CIULLI, A.; ABELL, C. Optimization of inhibitors of Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase based on group efficiency analysis. **ChemMedChem**, v.11, 38–42, 2016.

HUNG, L.-H.; GUERQUIN, M.; SAMUDRALA, R. GPU-QJ, a fast method for calculating root mean square deviation (RMSD) after optimal superposition. **BMC Res. Notes**, v.4, p.97, 2011.

JACKSON, M.; MCNEIL, M.; BRENNAN, P. Progress in targeting cell envelope biogenesis in Mycobacterium tuberculosis. **Future microbiology**, v. 8, n. 7, p. 855–75, jul. 2013.

INSTITUTO HIDROGRÁFICO. Disponível em: www.hidrografico.pt. Acesso em: janeiro/2020.

JING, Y.; EASTER, A.; PETERS, D.; KIM, N.; ENYEDY, I.J. In silico prediction of hERG inhibition. **Future Med Chem**, v.7, cap.5, p. 571-86, 2015.

KANAMARU, T.; NAKANO, Y.; TOYODA, Y.; MIYAGAWA, K.-I.; TADA, M.; KAISHO, T.; NAKAO, M.; In Vitro and In Vivo Antibacterial Activities of TAK-083, an Agent for Treatment of Helicobacter pylori Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p. 2455, 2001.

KANZAKI, A.; TAKEBAYASHI, Y.; REN, X.Q.; MIYASHITA, H.; MORI, S.; AKIYAMA, S.; POMMIER, Y. Overcoming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743. **Mol. Cancer Ther.**, v.1. p.1327–1334, 2002.

KELMAN, D.; POSNER, E.K.; MCDERMID, K.J.; TABANDERA, N.K.; WRIGHT, P.R.; WRIGHT, A.D. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. **Marine Drugs**, v.10, p. 403-416, 2012.

KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discov.Today**, v.11, p.580-594, 2006.

KNIME. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.knime.com/>>.

KODE INFORMATICS SRL. Dragon 7.0. Disponível em: <https://chm.kode-solutions.net/products_dragon.php>.

KOUL, A. et al. Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. **Nat. Chem. Biol.**, v. 3, n. 6, p. 323–324, 2007.

KOUL, A. et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483–490, 2011.

KUMAR, S.; KAUR, H.; SAXENA, K. K.; SHARRNA, M.; VISHWAKARMA, P.; KUMAR, A.; Synthesis and antiparkinsonian activity of some new adamantyl thiazolidinonyl/azeti-dinonyl indole derivatives. **Indian Journal of Chemistry**, v.49B, p.1398, 2010.

LAMICHHANE, G.; **Trends Mol. Med.**, v.17, p.25, 2011.

LIMA, C. H. DA S.; BISPO, M. D. L. F.; SOUZA, M. V. N. DE. Pyrazinamide: An Essential Drug in the Tuberculosis Treatment. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, 2011.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.46, p.3-26, 2001.

LIRA, N.S. Estudos químicos dos organismos marinhos *Aplysina fistularis* Pallas e *Sargassum polyceratum* Montagne. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

LOOK, S. A.; FENICAL, W.; JACOBS, R. S.; & CLARDY, J. As pseudopterosinas: produtos naturais anti-inflamatórios e analgésicos do chicote do mar

Pseudopterogorgia elisabethae. **Anais da Academia Nacional de Ciências**, v. 83, n. 17, p. 6238-6240, 1986.

LORENZO, V. P. Estudo fitoquímico com fins farmacológicos da alga bentônica *Caulerpa racemosa*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

LYNCH, T.; PRICE, A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. **American Family Physician**, v. 76, p. 391-396, 2007.

MACEDO, N.R.R.P.; RIBEIRO, M.S.; VILLAÇA R.C.; FERREIRA W.; PINTO, A.M.; TEIXEIRA, V.L.; CIRNE-SANTOS, C.; PAIXÃO, I.C.N.P.; GIONGO, V. Caulerpin as a potential antiviral drug against herpes simplex vírus type 1. **Rev. Bras. Farmac**, v.22, p.861-867, 2012.

MAHDI, S.; AZZI, R.; LAHFA, F. B. Evaluation of in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential and hemolytic effect of phenolic enriched fractions of the aerial part of *Salvia officinalis* L. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.14, n.4, p. 689-694, 2020.

MAITI, B.C.; THOMSON, R.H.; MAHENDRAN, M. A estrutura de caulerpin, um pigmento de algas *Caulerpa*. **J Chem Res Synop**, v.4, p.126-127, 1978.

MANJUNATHA, U.; BOSHOF, H. I.; BARRY, C. E. The mechanism of action of PA-824. **Commun. Integr. Biol.**, v. 2, n. 3, p. 215–218, 2009a.

MAKAROV, V.; LECHARTIER, B.; ZHANG, M.; NERES, J.; VAN DER SAR, A.M.; RAADSEN, S.A.; HARTKOORN, R.C.; RYABOVA, O.B.; VOCAT, A.; DECOSTERD, L.A. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. **EMBO Mol. Med.**, v.6, p. 372–383, 2014.

MANTIK, P.; XIE, M.; WONG, H.; LA, H.; STEIGERWALT, R. W.; DEVANABOYINA, U.; GANEM, G.; SHIH, D.; FLYGARE, J. A.; FAIRBROTHER, W. J.; CHAKRAVARTY,

P.; RUSSELL, D.; FERNANDEZ, G. E; NARANG, A. S. Cyclodextrin Reduces Intravenous Toxicity of a Model Compound. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.108, n.6, p. 1934-1943, 2019.

MARUDHUPANDI, T.; KUMAR, T.T.; SENTHIL, S.L.; DEVI, K.N. In vitro antioxidant properties of fucoidan fractions from *Sargassum tenerrimum*. **Pacote J. Biol. Sei**, v. 17, n. 3, p. 402-7, 2014.

MATSUMOTO, M. et al. OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis In Vitro and In Mice. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 11, p. e466, 2006.

MARVIN SKETCH. Disponível em: <<https://chemaxon.com/products/marvin>>.

MATTHEWS, B. W. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. **BBA - Protein Structure**, v. 405, n. 2, p. 442–451, 1975.

MEDEIROS, H.I.R.; CAIANA, R.R.A.; FERNANDES, N.D.; MEDEIROS JÚNIOR, F.C.M.; SCOTTI, M.T.; SCOTTI, L.; FREITAS, J.C.R. Rational planning of a drug candidate: in silicostudies, synthesis and structural elucidation. **Res Soc. and Dev.** v. 9, p. 1-27, 2020.

MENG, M. et al. Simultaneous quantitation of delamanid (OPC-67683) and its eight metabolites in human plasma using UHPLC-MS/MS. **Journal of chromatography. B. Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v.1002, p.78–91, 2015.

MICROSOFT EXCEL. No Title. Disponível em: <<https://office.live.com/start/Excel.aspx?ui=pt-BR>>.

MIGLIORI, G.B., THONG PM, AKKERMAN O, ALFFENAAR, J.W., ÁLVAREZ-NAVASCUÉS, F., ASSAO-NEINO, M.M., et al. Worldwide Effects of Coronavirus Disease Pandemic on Tuberculosis Services, January-April 2020. **Emerg Infect Dis.** V.26, n.11, p. 2709-2712, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem**. 1ªed. Brasília-DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011.

MIOSO, R.; MARANTE, F. J. T.; BEZERRA, R. D.S.; BORGES, F. V. P.; SANTOS, BV, & LAGUNA, I. H. B. D. Compostos citotóxicos derivados de esponjas marinhas. Uma revisão (2010-2012). **Moléculas**, v. 22, n. 2, pág. 208, 2017.

MOLINSPIRATION CHEMINFORMATICS. Disponível em: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Acesso em: março 2021.

MURADÁS, T. C.; ABBADI, B. L.; VILLELA, A. D.; MACCHI, F. S.; BERGO, P. F.; FREITAS, T. F.; SPEROTTO, N. D. M.; TIMMERS, L. F. S. M.; SOUZA, O. N.; PICADA, J. N.; FACHINI, J.; 64 SILVA, J. B.; ALBUQUERQUE, N. C. P.; HABENSCHUS, M. D.; CARRÃO, D. B.; ROCHA, B. A.; BARBOSA JUNIOR, F.; OLIVEIRA, A. R. M.; MASCARELLO, A.; NEUENFELDF, P.; NUNES, R. J.; MORBIDONI, H. R.; CAMPOS, M. M.; BASSO, L. A.; RODRIGUES- JUNIOR, V. S. Pre- clinical evaluation of quinoxaline- derived chalcones in tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 01- 13, 2018.

NAHID, P. et al. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 200, n. 10, p. e93–e142, 2019.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Curr. Drug Targets**, v.7, p.279-304, 2006.

OLIVEIRA, W. N.; ALENCAR, E. N.; ROCHA, H. A. O.; AMARAL-MACHADO, L.; EGITO, E. S. T. Nanostructured systems increase the in vitro cytotoxic effect of bullfrog oil in human melanoma cells (A2058). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.145, p. 112438, 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Dia Mundial da Tuberculose**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/campanhas/dia-mundial-da-tuberculose-2022>. Acesso em 21 mar 2022.

PALOMINO, J. C.; LEAO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis** 2007: From basic science to patient care.

PAGANO, M.; FAGGIO, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. **Cell biochemistry and function**, v. 33, n. 6, p. 351-355, 2015.

PAI, M.; BEHR, M.; DOWDY, D. et al. Tuberculose. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v.2, p.16076, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>. Acesso em: 04 de março de 2023.

PANICKER, A.T.; DALAL, Y. M.; KUMAR, M. S. Algae-assisted synthesis of nanoparticles and their applications. **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**, cap.3, p.55-77, 2022.

PARIKH, S. L.; XIAO, G.; TONGE, P. J. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. **Biochemistry**, v. 39, p. 7645–7650, 2000.

PASQUALOTO, K. F. M. et al. Rational design of new antituberculosis agents: Receptor [1] Independent four-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of a set of isoniazid derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 15, p. 3755–3764, 15 jul. 2004.

PATRICK, G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*, **Oxford University Press: New York**, cap.16; 2005

PIETKIEWICZ, J.; ZIELIŃSKA, K.; SACZKO, J.; KULBACKA, J.; MAJKOWSKI, M.; WILK, K. A. New approach to hydrophobic cyanine-type photosensitizer delivery using polymeric oil-cored nanocarriers: Hemolytic activity, in vitro cytotoxicity and localization

in cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, n.5, p. 322-335, 2010.

PRAKOESWA, C.R.S.; PURWANTO, D.A.; ENDARYANTO, A. Molecular docking of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on keap1-nrf2 complex protein in photoaging prevention. **Medico-Legal Updat.**, v.20, p.305–311, 2020.

PROCÓPIO, M. J. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. **FIOCRUZ/ENSP/EAD**: Rio de Janeiro, 2008.

PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R. Drogas do mar - oportunidades e obstáculos. **Marine Drugs**, v. 1, n. 4, p. 5-17, 2003.

PROTEIN DATA BANK (PDB)- RCSB Protein Data Bank. Disponível em: <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Acesso em: 15 jan. 2022.

Pubchem®. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: março/2021

RAJASEKHAR, K.K.; RAJENDRAPRASAD, Y.; SHANKARANANTH, V.; HARIKA, K.S; RAJANI, K.; PADMAVATHAMMA, M. Predição in silico de propriedades farmacocinéticas, biológicas e tóxicas selecionadas de algumas 1,3,5-trissubstituídas-2-pirazolinas derivadas do ácido isonicotínico. **J Glob Trends Pharm Sci**, v.2, n.4, p.489-512, 2011.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E.L.A.; SUSINI, S.M.M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v.35, p.305-309, 1997.

RAUNIO, H.; KUUSITO, M.; JUVONEN, R.; PENTIKAINEN, O. Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. **Front. Pharmacol**, v. 6, p. 123, 2015.

REDDY, G.S.; PAL, M. Indole Derivatives as Anti-Tubercular Agents: An Overview on their Synthesis and Biological Activities. **Curr. Med. Chem.**, v. 28, p.4531–4568, 2020.

RODE, H.B.; LADE, D.M.; GRÉE, R.; MAINKAR, P.S.; CHANDRASEKHAR, S. Strategies towards the synthesis of anti-tuberculosis drugs. **Org. Biomol. Chem.** v.17, p.5428–5459, 2019.

ROSSMAN, M.G.; LILJAS, A.; BRÄNDÉN, C.I. & BANASZAK, L.J. 2 Relações evolutivas e estruturais entre desidrogenases. Em *As enzimas* (Vol. 11, pp. 61-102). **Academic Press.**, v.11, p.61-102, 1975.

RINEHART, K. L. Antitumor compounds from tunicates. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, n. 1, p. 1-27, 2000.

ROUSSIS, V. W. U. Z.; FENICAL, W.; STROBEL, S. A.; VAN DUYNE, G. D.; & CLARDY, J. Novas pseudopterosinas anti-inflamatórias do octocoral marinho *Pseudopterogorgia elisabethae*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 4916-4922, 1990.

ROY, K.; KAR, S.; AMBURE, P. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 145, p. 22–29. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.04.013>>.

ROZWARSKI, D. A et al. Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 22, p. 15582–15589, 1999.

RUSTOMJEE, R.; ZUMLA, A. Delamanid expanded access novel treatment of drug resistant tuberculosis. **Infection and Drug Resistance**, v.8, p. 359, 2015.

SALDÍVAR-GONZÁLEZ, F.; PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; MEDINA-FRANCO, J. L. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. **Educacion Quimica**, v.28, p.51-58,2017.

SALTCORNER. Algae. Disponível em: <<http://www.saltcorner.com/LMAM/ShowChapter.php?ChapterID=18>>. Acesso em: jan/2018.

SAEED, N.; KHAN, M. R.; SHABIR, M. Atividade antioxidante, teores de fenólicos totais e flavonóides totais de extratos de plantas inteiras *Torilis leptophylla* L. **BMC medicina complementar e alternativa**, v. 12, n. 1, pág. 1-12, 2012.

SANGUINETTI, M. C; TRISTANI-FIROUZI, M. HERG potassium channels and cardiac arrhythmia. **Nature**, v. 440, p. 463-469, 2006.

SANTOS, J. L. et al. New Antitubercular Drugs Designed by Molecular Modification. In: CARDONA, P.-J. (Ed.). **Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance**. [s.l.] Intech, p. 169–186, 2012.

SANTOS, J. L. et al. Synthetic Organic Compounds as Potential Antitubercular Drugs: A Review of the Progress Made in the Last Five Years. In: BEATRIZ, A.; LIMA, D. P. (Ed.). *Recent Advances in the Synthesis of Organic Compounds to Combat Neglected Tropical Diseases*. 1st. ed. Sharjah: **Bentham Science**, p. 231–266, 2014.

SANTOS, M. B.; MARQUES, B. C.; AYUSSO G. M.; GARCIA, M. A. R.; PARACATU, L. C.; PAULI, I.; BOLZANI, V. S.; ANDRICOPULO, A. D.; XIMENES, V. F.; ZERAIK, M. L.; REGASINI, L.O. Chalcones and their B-aryl analogues as myeloperoxidase inhibitors: In silico, in vitro and ex vivo investigations. **Bioorganic Chemistry**, v.110, p. 104773, 2021.

SHAREEF, M. A.; SIRISHA, K.; SAYEED, I. B.; KHAN, I.; GANAPATHI, T.; AKBAR, S., ... & BABU, B. N. Synthesis of new triazole fused imidazo [2, 1-b] thiazole hybrids with emphasis on *Staphylococcus aureus* virulence factors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v.29, n.19, p.126621, 2019.

SILVA DA. Screening of natural products with the potential to treat diseases caused by *Helicobacter pylori*: an in vitro and in silico study. **Campo Mourão: Federal Technological University of Paraná**. p.108, 2015.

SILVA, D. R.; MELLO, F. C. D. Q.; D'AMBROSIO, L.; CENTIS, R.; DALCOLMO, M. P. & MIGLIORI, G. B. Tuberculose e COVID-19, o novo dueto maldito: quais as diferenças entre Brasil e Europa? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.47, 2021.

SILVA, W.; BISPO, M. L. F.; ORSATO, A. Indole: a Versatile and Promising Heterocycle for the Discovery of Novel Antibacterial and Antifungal Agents, **Rev. Virtual Quim.**, v.14, n.4, p. 612-636, 2022.

Sítio da Plataforma Integrity. Disponível em https://integrity.clarivate.com/integrity/xmlxsl/pk_prod_list.prod_list_graph_pr?p_origen=PROD&p_session_id=32298013&p_graph_value_type=PHASE: Acesso em: 24 novembro 2022.

Sítio da Plataforma Integrity. Disponível em: <https://integrity.clarivate.com/integrity/xmlxsl/>. Acesso em: 24 novembro 2022.

Sítio do Banco de Dados DrugBank. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00361>. Acesso em: 24 novembro 2022.

SLAMA, N. et al. Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC dehydratases from Mycobacterium tuberculosis type II fatty acid synthase system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 412, n. 3, p. 401–6, 2 set. 2011.

SLIWOSKI, G. et al. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–95, jan. 2014.

SONANI, R. R.; RASTOGI, R. P.; MADAMWAR, D. Natural Antioxidants From Algae: A Therapeutic Perspective. **Algal Green Chemistry: Recent Progress**, cap.5, p.91-120, 2017.

SOUSA, J. C. F. Semi-síntese de Novos Derivados da Caulerpina e Avaliação da Atividade Leishmanicida do Ácido Caulerpínico. Tese (Doutorado do Programa de Pós-

graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, 2016.

SOUZA, E. T.; LIRA, D. P. L.; QUEIROZ, S. D. J. C.; AQUINO, A.B.; MELLA, E.A.C.; LORENZO, V.P.; MIRANDA, G.E.C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; CHAVES, M.C.O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ATHAIDE-FILHO, P.F.; SANTOS, B.V.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.Z. Antinociceptive activities of crude methanolic extract phases, n-butanolic, chloroformic and ethyl acetate from *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, p. 115-120, 2009a.

SOUZA, E. T.; LIRA, D. P.; QUEIROZ, A. C.; SILVA, D. J. C.; AQUINO, A. B.; MELLA, E. A. C.; LORENZO, V. P.; MIRANDA, G. E. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; CHAVES, M. C. O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. The antinociceptive and anti-inflammatory actives of Caulerpin, a bisindole alkaloid, isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**. v.7. n.4, p. 689-704, 2009b.

SOUZA, L.G.; SALUSTIANO, E. J.; COSTA, K. M.; COSTA, A. T.; RUMJANEK, V. M.; DOMINGOS, J.L.O.; RENNO, M. N.; COSTA, P. R.R. Synthesis of new α -Aryl- α -tetralones and α -Fluoro- α -aryl- α -tetralones, preliminary antiproliferative evaluation on drug resistant cell lines and in silico prediction of ADMETox properties. **Bioorganic Chemistry**, v.110, 2021.

SUN, H.; CHOW, E. C. Y.; LIU, S.; DU, Y.; PANG, K. S. The Caco-2 Cell Monolayer: Usefulness and Limitations. **Opinião de especialistas sobre metabolismo de drogas e toxicologia**, v.4, p.395-411, 2008.

TARIQ, S.; KHALID, M.; RAZA, A.R.; RUBAB, S.L.; DE ALCÂNTARA MORAIS, S.F.; KHAN, M.U. ... & BRAGA, A.A.C. Investigações experimentais e computacionais de novos derivados de indol: Uma análise espectroscópica combinada, SC-XRD, DFT/TD-DFT e QTAIM. **Journal of Molecular Structure**, v.1207, p.127803, 2020.

TAYLOR, D. The Pharmaceutical Industry and the Future of Drug Development. **Pharmaceuticals in the Environment**, p. 1-33, 2015.

VARMA, M.V.; SATEESH, K.; PANCHAGNULA, R. Functional role of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of drugs: contribution of passive permeability to P-glycoprotein mediated efflux transport. **Mol Pharm.** v.2 p. 12-21, 2005.

VASANTHANATHAN, P.; HRITZ, J.; TABOUREAU, O.; OLSEN, L.; Virtual Screening and Prediction of Site of Metabolism for Cytochrome P450 1A2 Ligands. **Journ. of Chem. Inf. and Mod.** v.49 p.43-52, 2009.

VIANA, J. O., SCOTTI, M. T., & SCOTTI, L. Computer-aided Drug Design Investigations for Benzothiazinone Derivatives Against Tuberculosis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 23, cap.1, p. 66-82, 2020.

VIJAYABASKAR, P.; VASEELA, N. In vitro antioxidant properties of sulfated polysaccharide from brown marine algae *Sargassum tenerrimum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, p. 890-896, 2012.

WALLACE, A.C.; LASKOWSKI R.A. and THORNTON, J.M. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions, **Protein Eng.**, v.8, p.127-134, 1995.

WALSH, C. Antibióticos: ações, origens, resistência. **Sociedade Americana de Microbiologia (ASM)**, 2003.

WELLS, M. L.; POTIN, P.; CRAIGIE, J. S.; RAVEN, J. A.; MERCHANT, S. S.; HELLIWELL, K. E., ... & BRAWLEY, S. H. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. **Journal of applied phycology**, v.29, p.949-982, 2017.

WEFFORT-SANTOS, A. M.; ARBOS, K. A.; CLARO, L. M.; BORGES, L.; SANTOS, C. A. M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidante capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v.28, p.457-463, 2008.

WERMUTH, C.G. Estratégias na Busca de Novos Compostos de Chumbo ou Hipóteses de Trabalho Originais. In: A Prática da Química Medicinal, San Diego. **Academic Press**, 69-89, 2003.

WERMUTH, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. 3° ed. London: **Academic Press**, 2008.

WYNNE, M. J. A. Checklist of benthic marine algae of red prisms from *Caulerpa sertularioides*. **Huaxue Shijie**, v. 20, n.5, p 265-266, 1998.

WICHARD, J.D. In silico prediction of genotoxicity. **Food and Chem. Tox.**, v. 106, p. 595-599, 2017.

WINDER, F.G.; COLLINS, P. B. Inibição por isoniazida da síntese de ácidos micólicos em *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, v.63, n. 1, p. 41-48, 1970.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global tuberculosis report 2021**. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>. Acesso em: 23 nov. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Geneva: WHO; c2020 [updated 2020 Oct 15; cited 2021 Sep 1]. **Global Tuberculosis Report 2020**. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2013**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2014**. [s.l: s.n.].

WHO. **WHO: Global Tuberculosis Report 2015**. Switzerland: [s.n.].

YADAVALLI, R.; PEASARI, J. R.; MAMINDLA, P.; PRAVEENKUMAR; MOUNIKA, S.; GANUGAPATI, J. Phytochemical screening and in silico studies of flavonoids from *Chlorella pyrenoidosa*. **Informatics in Medicine Unlocked**, v.10, p. 89-99, 2018.

YEE, S. In Vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man—Fact or Myth. **Pharmaceutical Research**, v.14, p.763-766, 1997.

ZHANG, Y. et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 591–593, 1992.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. As curiosas características da pirazinamida: uma revisão. **O jornal internacional de tuberculose e doenças pulmonares**, v.7, n.1, p.6-21, 2003.

ZHANG, N.; TORELLES, J. B.; McNEIL, M. R.; ESCUYER, V. E.; KHOO, K.; BRENNEN, P. J.; CHATTERJEE, D. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinisylation of lipoaranamannan and arabinagalactan Via Na N- terminal recognition region and C-terminal synthetic region. **Molecular Microbiology**, v. 1, n. 50, p. 69-76, 2003.

