



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

YVNNI MARIA SALES DE MEDEIROS E SILVA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE
POTENCIAIS FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIAISMÁTICOS A
PARTIR DE *SCAFFOLDS* HÍBRIDOS ISATÍNICOS HIDRAZÔNICOS**

CAMPINA GRANDE

2024

YVNNI MARIA SALES DE MEDEIROS E SILVA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE
POTENCIAIS FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIASMÁTICOS A
PARTIR DE *SCAFFOLDS* HÍBRIDOS ISATÍNICOS HIDRAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Química medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Igor José dos Santos Nascimento.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

CAMPINA GRANDE

2024

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586p Silva, Yvnni Maria Sales de Medeiros e.
Planejamento, síntese, avaliação *in silico* e *in vitro* de potenciais fármacos anti-inflamatórios e antiasmáticos a partir de *scaffolds* híbridos isatinícos hidrazônicos [manuscrito] / Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva. - 2024.
144 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.
"Orientação : Prof. Dr. Igor José dos Santos Nascimento, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS. "
1. Derivados híbridos. 2. Doenças inflamatórias. 3. Asma.
I. Título

21. ed. CDD 615

YVNNI MARIA SALES DE MEDEIROS E SILVA

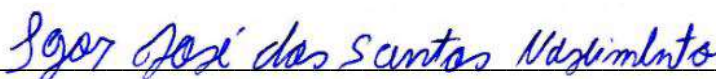
**PLANEJAMENTO, SÍNTESE, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE
POTENCIAIS FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIASMÁTICOS A
PARTIR DE *SCAFFOLDS* HÍBRIDOS ISATÍNICOS HIDRAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Química medicinal.

Aprovada em 30/01/2024

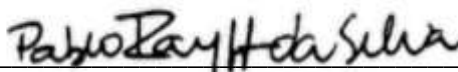
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Igor José dos Santos Nascimento (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Pablo Rayff da Silva
Universidade Federal da Paraíba (UFCG)

*À Deus que nunca me deixou desistir
dos meus propósitos nos momentos difíceis,
À minha mãe Niedja, minha avó Neusa
e minha namorada Aline, por todo amor,
dedicação e apoio incondicional,*
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças todos os dias dessa jornada, principalmente naqueles que pareciam impossíveis de vencer, por me curar quando estive doente e acalmar meu coração e mente. Sendo sempre minha fonte de energia, determinação e foco, que segue segurando minha mão e me fazendo acreditar nos meus objetivos.

À minha mãe, Niedja, que desde muito cedo ensinou-me a importância da dedicação aos estudos, acima de tudo sempre me apoiou nesse sentido, me deu forças e abraçou essa jornada comigo com muito amor. À minha avó, Neusa, por todo amor, cuidado e incentivo, desde muito nova quando me ajudou na escrita das minhas primeiras letras.

À minha namorada, Aline, por todo amor, compreensão, apoio e dedicação. Com você tudo foi o mais equilibrado possível tendo em vista a realidade que envolve a Pós-Graduação, às vezes foi necessário abdicar de algumas coisas, mas sempre tivemos o mais importante: nosso amor incondicional, que transpôs todos os momentos de dificuldade.

Aos meus amigos (*my chosen family*) pelo amor, apoio, incentivo, compreensão e leveza, sendo cada um especial a sua maneira, carrego vocês no coração. E à minha psicóloga, Camila, que auxiliou no meu autoconhecimento e evolução, sempre acreditando em mim, mesmo quando eu mesma não conseguia visualizar as possibilidades dentro da minha realidade.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Igor José dos Santos Nascimento e Prof. Dr. Ricardo Olímpio, pela confiança, apoio e incentivo. A contribuição de vocês foi essencial para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal, muito obrigada, saibam que vocês sempre serão uma inspiração para mim!

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF), por todo companheirismo, acolhimento e apoio. Eu sou extremamente grata pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

Aos colaboradores, Professor Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo pelas análises de IV e RMN que foram realizadas na Central Multiusuário de Análise e Caracterização Químico-Biológica (CMAC-Quim-Bio) inserida no Campus V da UEPB, e Professora Dra. Cristiane Flora Villarreal pela realização das análises *in vitro* que foram executadas no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (LAFTE) da Universidade Federal da Bahia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Love is a bird, she needs to fly
Let all the hurt inside of you die
You're frozen when your heart's not open.”
Madonna – Frozen*

RESUMO

O processo inflamatório quando persistente e não resolutivo pode desencadear doenças inflamatórias crônicas, como a asma, cujo tratamento de escolha ocasiona tremores, taquicardia, perda de densidade óssea, hiperglicemia etc. Ademais, os AINES que representam a classe mais utilizada para doenças inflamatórias apresentam efeitos adversos gástricos e riscos cardiovasculares quando não seletivos e seletivos para COX-2, respectivamente. Em vista da demanda por novos *scaffolds*, esse estudo tem como objetivo desenvolver novos derivados isatínicos hidrazônicos híbridos com potencial atividade para anti-inflamatória e antiasmática. Desse modo, foi realizada uma avaliação preliminar por ancoragem molecular no programa Gold 5.8.1, utilizando as estruturas cristalográficas da COX-2, mPGES-1, iNOS, NLRP3, 5-LOX, LTA₄H e cisLT1 obtidas através do *Protein Data Bank (PDB)*. Posteriormente, os derivados YV01 – YV04 foram sintetizados por uma rota sintética linear, seguida de caracterização físico-química e estrutural por técnicas espectroscópicas. Associada à predição do perfil farmacocinético e de *druglikeness in silico* nas plataformas do *SwissADME* e *PkCSM*, seguido da avaliação *in vitro* da viabilidade celular utilizando Alamar blue frente a macrófagos e quantificação de nitrito pelo método de Griess, bem como execução de estudos de dinâmica molecular (DM) pelo software GROMACS. As avaliações *in silico* demonstraram que YV-03 e YV-02 possuem melhor perfil anti-inflamatório e antiasmático, respectivamente. E Todos os compostos possuem perfil farmacocinético ADME e *druglikeness* adequado. Cujas rotas sintéticas apresentaram rendimentos entre 69,67 e 92,90%, com parâmetros físico-químicos adequados. A caracterização por IV e RMN, destacou-se a presença de bandas sugestivas de amina secundária em 3396 cm⁻¹, carbonila de amida em 1680 cm⁻¹, e padrão de compostos monossustituídos e parassustituídos. Somado à identificação de uma mistura de estereoisômeros Z-E e conformeros, por dois simpletos sugestivos do CH₂ em 4,97 e 4,55 ppm, seguido de sinais em 9,70 e 10,48 ppm (CH=N). Os estudos *in vitro* evidenciaram baixa citotoxicidade em macrófagos e o YV-03 reduziu os níveis de nitrito em concentrações entre 0,9 – 125 µM. De forma complementar, as simulações de DM apontam que o possível mecanismo do YV-03 está ligado à inibição de iNOS e o YV-02 relacionado à inibição de LTA₄H. Conclui-se que os derivados isatínicos hidrazônicos apresentaram potencial anti-inflamatório e antiasmático e tem-se como perspectiva a continuidade da avaliação *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: derivados híbridos; doenças inflamatórias; asma

ABSTRACT

The inflammatory process when persistent and not resolute can trigger chronic inflammatory diseases, such as asthma, whose treatment of choice causes tremors, tachycardia, loss of bone density, hyperglycemia etc. In addition, NSAIDs that represent the most used class for inflammatory diseases present gastric adverse effects and cardiovascular risks when non-selective and selective for COX-2, respectively. In view of the demand for new scaffolds, this study aims to develop new hybrid isatinic hydrazonic derivatives with potential anti-inflammatory and antiasthmatic activity. Thus, a preliminary evaluation was performed by molecular docking in the Gold 5.8.1 software, using the crystallographic structures of COX-2, mPGES-1, iNOS, NLRP3, 5-LOX, LTA₄H and cisLT1 obtained through the Protein Data Bank (PDB). Subsequently, the YV01 – YV04 derivatives were synthesized by a linear synthetic route, followed by physical-chemical and structural characterization through spectroscopic techniques. Associated with the prediction of the pharmacokinetic profile and druglikeness *in silico* using SwissADME and PkCSM platforms, then there were *in vitro* analysis of cell viability using Alamar blue against macrophages and nitrite quantification through the Griess method, and execution of molecular dynamics (DM) studies by GROMACS software. *In silico* evaluations showed that YV-03 and YV-02 have better anti-inflammatory and anti-asthmatic profiles, respectively. And all compounds have suitable ADME pharmacokinetic profile and druglikeness. The synthetic route showed yields between 69.67 and 92.90%, with adequate physical-chemical parameters. The characterization by IR and NMR, evidenced the presence of bands suggestive of secondary amine in 3396 cm⁻¹, amide carbonyl in 1680 cm⁻¹, and pattern of monosubstituted and parassubstituted compounds. In addition to the identification of a mixture of Z-E stereoisomers and conformers, via two simplets suggestive of CH₂ at 4.97 and 4.55 ppm, followed by signals at 9.70 and 10.48 ppm (CH=N). *In vitro* studies showed low cytotoxicity in macrophages and YV-03 reduced nitrite levels at concentrations between 0.9 125 μM. Moreover, DM simulations indicated that the possible mechanism of YV-03 is linked to iNOS inhibition and YV-02 is related to LTA₄H inhibition. It is concluded that the isatinic hydrazonic derivatives presented anti-inflammatory and antiasthmatic potential and as a perspective the studies will be continued through *in vitro* and *in vivo* evaluation.

Keywords: hybrid derivatives; inflammatory diseases; asthma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cascata dos mediadores lipídicos.....	23
Figura 2 – Mecanismo T _H 2 e fases da patogênese	24
Figura 3 – Vias aéreas: (A) Normal (B) Asmática	25
Figura 4 – Número de mortes atribuídas às CRDs para ambos os sexos em 2019 no mundo ..	26
Figura 5 – Estruturas químicas de agonistas β_2 -adrenérgicos	28
Figure 6 – Estrutura química da teofilina	29
Figura 7 – Estruturas químicas de corticosteroides	30
Figura 8 – Mecanismo de ação anti-inflamatória dos corticosteroides na asma	31
Figura 9 – Estruturas químicas de antileucotrienos	32
Figura 10 – Estruturas químicas dos envolvidos na terapia convencional anti-inflamatória ...	35
Figura 11 – Estrutura química do ácido araquidônico.....	36
Figura 12 – Representação do alvo farmacológico COX-2.....	37
Figura 13 – Atividade catalítica do alvo mPGES-1 envolvendo dois mecanismos	38
Figura 14 – Transformação do LTA ₄ em LTB ₄ pela ação da enzima LTA ₄ hidrolase.....	41
Figura 15– Estrutura química do LTD ₄	42
Figura 16 – Representação figurativa dos tipos de híbridos.....	45
Figura 17 – Árvore de decisão de Topliss	46
Figura 18 – Estrutura química da isatina	49
Figura 19 – Estrutura química do composto 1	50
Figura 20 – Estrutura química do composto 2.....	50
Figura 21 – Estrutura química dos compostos 3-5	51
Figura 22 – Estrutura química do composto 6.....	52
Figura 23 – Estruturas químicas dos compostos JR-09, JR-19 e AMZ-BZ	53
Figura 24– Compostos híbridos isatínicos hidrazônicos planejados	65
Figura 25 – Ligantes cocrystalizados a COX-2 (A), mPGES-1 (B), NLRP3 (C) e iNOS (D)..	66
Figura 26 – Sobreposição da pose de redocking e ligante cocrystalizado: COX-2 (A), mPGES-1 (B), NLRP3 (C) e iNOS (D).....	68
Figura 27 – Representação das interações do Rofecoxibe (A) e Celecoxibe (B) na COX-2 ...	69
Figura 28 – Representação das interações das poses 21 (A) e 9 (B) do YV-03 na COX-2	70
Figura 29 – Representação das interações do YV-01 (A), YV-02 (B) e YV-04 (C) na COX-2	70
Figura 30 – Representação das interações do ligante cocrystalizado a mPGES-1	71

Figura 31 – Representação das interações do YV-01 (A) e YV-02 (B) na mPGES-1	71
Figura 32 – Representação das interações do YV-03 (A) e YV-04 (B) na mPGES-1	71
Figura 33 – Representação das interações do ligante cocrystalizado ao NLRP3	72
Figura 34 – Representação das interações do YV-01 (A), YV-03 (B) e YV-04 (C) no NLRP3	73
Figura 35 – Interações das poses 45 (A), 19 (B) e 72 (C) do YV-02 no NLRP3.....	73
Figura 36 – Representação das interações do ligante AR-C95791 (A) e YV-03 (B) no iNOS	74
Figura 37 – Representação das interações do YV-01 (A), YV-02 (B) e YV-04 (C) no iNOS	74
Figura 38 – Ligantes cocrystalizados a 5-LOX (A), LTA ₄ H (B) e CisLT1 (C).....	75
Figura 39 – Sobreposição da pose de <i>redocking</i> e ligante cocrystalizado: 5-LOX (A), LTA ₄ H (B) e CisLT1 (C).....	76
Figura 40 – Representação das interações do ligante AKBA cocrystalizado à 5-LOX	77
Figura 41 – Interações do YV-01 (A), YV-02 (B), YV-03 (C) e YV-04 (D) na 5-LOX.....	78
Figura 42 – Representação das interações do ligante Bestatina cocrystalizado à LTA ₄ H	79
Figura 43– Representação das interações do YV-01 (A) e YV-02 (B) na LTA ₄ H	80
Figura 44 – Representação das interações do YV-03 (A) e YV-04 (B) na LTA ₄ H	80
Figura 45 – Representação do ligante zafirlucaste cocrystalizado ao cisLT1	82
Figura 46 – Interações do YV-01 (A), YV-02 (B), YV-03 (C) e YV-04 (D) no cisLT1	82
Figura 47 – Mecanismo de reação para a obtenção dos intermediários AV	83
Figura 48 – Mecanismo de reação para a obtenção dos intermediários AAV	84
Figura 49 – Mecanismo de reação para a obtenção dos intermediários AVH	85
Figura 50 – Mecanismo de reação para a obtenção dos compostos finais YV 01-04	86
Figura 51 – Representação comparativa dos espectros de IV dos compostos intermediários .	89
Figura 52 – Espectro de IV do composto final YV-01	90
Figura 53 – Espectro de IV do composto final YV-04.....	91
Figura 54 – Isômeros Z-E possíveis do composto YV-01.....	94
Figura 55 – Estereoisômeros Z-E possíveis do composto YV-01	94
Figura 56 – Modelo boiled-egg dos derivados híbridos isatínicos hidrazônicos	98
Figura 57 – Efeito dos compostos YV01-04 sobre à viabilidade de macrófagos.....	101
Figura 58 – Efeito dos compostos YV01-04 sobre à viabilidade de macrófagos.....	102
Figura 59 – Resultados da simulação de dinâmica molecular no iNOS: A) RMSD de C α , B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D/E) SASA, F) Rg e G) Ligações de hidrogênio	103
Figura 60 – Resultados da simulação de dinâmica molecular na 5-LOX: A) RMSD de C α , B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D/E) SASA, F) Rg e G) Ligações de hidrogênio	105

Figura 61 – Resultados da simulação de dinâmica molecular na LTA₄H: A) RMSD de C α , B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D)Rg, E) SASA e F) Ligações de hidrogênio 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Derivados isatínicos hidrazônicos avaliados por ancoragem molecular	55
Tabela 2 – Valores de <i>score</i> relativos à ancoragem molecular com perfil anti-inflamatório...	67
Tabela 3 – Valores de <i>score</i> relativos à ancoragem molecular com perfil antiasmático.....	76
Tabela 4 – Características físico-químicas dos compostos finais.....	87
Tabela 5 – Características físico-químicas dos compostos finais.....	87
Tabela 6 – Valores de absorção obtidos pela espectroscopia de infravermelho	93
Tabela 7 – Resultados da análise por RMN 1H dos compostos finais	96
Tabela 8 – Perfil de solubilidade aquosa, lipofilicidade, absorção no TGI e permeabilidade Caco-2.....	97
Tabela 9 – Parâmetros considerados como critérios de druglikeness	99

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1– Planejamento de novos derivados isatínicos hidrazônicos	54
Esquema 2 – Rota sintética para a obtenção dos derivados isatínicos hidrazônicos híbridos ..	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AA –	Ácido araquidônico
ADME-Tox –	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AINES –	Anti-inflamatórios não esteroidais
Ala –	Alanina
AMPC –	Monofosfato cíclico de adenosina
Arg –	Arginina
Asp –	Aspartato
Asn –	Asparagina
CADD –	<i>Computer-aided drug design</i>
CisLT1 –	Receptor 1 de cisteinil-leucotrienos
CRDs –	Doenças respiratórias crônicas
COX –	ciclooxigenase
DAG –	diacilglicerol
DAMPs –	Padrões moleculares associados a danos
FBDD –	<i>Fragment-based drug design</i>
Gln –	Glutamina
Glu –	Glutamato
GSH –	glutathione
HAT –	acetiltransferase
HDAC2 –	histona deacetilase 2
His –	Histidina
Ile –	Isoleucina
iNOS –	óxido nítrico sintase induzível
IP3 –	Inositol 1,4,5-trifosfato
LABA	β_2 -agonistas de longa duração
LBDD –	<i>Ligand-based drug design</i>
LDSF –	Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos
Leu –	Leucina
LOX –	Lipoxigenases
LTA ₄ H –	leucotrieno A ₄ hidrolase
Lys –	Lisina

MHC II –	Complexo principal de histocompatibilidade II
m-PGES-1 –	prostaglandina E sintase 1 microssomal
NFκB –	Fator de transcrição nuclear κB
NLRP3 –	família NLR contendo 3
PAMPs –	Padrões moleculares associados a patógenos
PDE –	fosfodiesterases
Phe –	fenilalanina
PLA ₂ –	Fosfolipase A ₂
PLC –	fosfolipase C
QSAR –	relação estrutura-atividade quantitativa
SAR –	Relação estrutura-atividade
SBDD –	<i>Structure-based drug design</i>
Ser –	Serina
Thr –	Treonina
Trp –	Triptofano
Tyr –	Tirosina
Val –	Valina
5-LOX –	5-Lipoxigenase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1	Patogênese de doenças inflamatórias respiratórias	22
3.2	Epidemiologia de doenças inflamatórias respiratórias	25
3.3	Terapia convencional para asma	27
3.3.1	<i>Broncodilatadores</i>	27
3.3.1.1	<i>Agonistas β_2-adrenérgicos</i>	27
3.3.1.2	<i>Anticolinérgicos</i>	28
3.3.1.3	<i>Metilxantinas</i>	29
3.3.2	<i>Corticosteroides</i>	29
3.3.3	<i>Antileucotrienos</i>	32
3.3.4	<i>Terapia imunomoduladora</i>	33
3.4	Terapia convencional para doenças inflamatórias	34
3.5	Alvos com ação anti-inflamatória e antiasmática	35
3.5.1	<i>Cicloxigenase-2 (COX-2)</i>	36
3.5.2	<i>Prostaglandina E sintase 1 microssomal (mPGES-1)</i>	37
3.5.3	<i>Domínio pirina da família NLR contendo 3 (NLRP3)</i>	38
3.5.4	<i>Óxido nítrico sintase induzível (iNOS)</i>	39
3.5.5	<i>5-Lipoxigenase (5-LOX) e leucotrieno A4 hidrolase (LTA₄H)</i>	40
3.5.6	<i>Receptor 1 de cisteinil-leucotrienos</i>	42
3.6	<i>Identificação de novos scaffolds utilizando ferramentas da química medicinal</i>	42
3.6.1	<i>Planejamento de fármacos</i>	42
3.6.2	<i>Estratégias de modificação e otimização molecular</i>	44
3.6.2.1	<i>Bioisosterismo</i>	44
3.6.2.2	<i>Hibridação molecular</i>	45
3.6.2.3	<i>Árvore de decisão de Topliss</i>	45
3.6.3	<i>Abordagem computacional</i>	46
3.6.3.1	<i>Ancoragem molecular</i>	46
3.6.3.2	<i>Dinâmica molecular</i>	47

3.6.3.3	<i>Predição do perfil farmacocinético in silico e druglikeness</i>	48
3.7	Novos scaffolds promissores para a atividade anti-inflamatória e antiasma ..	49
4	METODOLOGIA	54
4.1	Delineamento de pesquisa	54
4.2	Ancoragem molecular	54
4.4	Metodologia de síntese dos compostos obtidos	56
4.4.1	<i>Síntese dos compostos intermediários</i>	56
4.4.1.1	<i>Síntese do AV (AV-01 e AV-02)</i>	56
4.4.1.2	<i>Síntese do AAV (AAV-01 e AAV-02)</i>	57
4.4.1.3	<i>Síntese do AVH (AVH-01 e AVH-02)</i>	58
4.4.2	<i>Síntese dos compostos híbridos finais</i>	58
4.4.2.1	<i>Síntese do YV-01 e YV-03</i>	58
4.4.2.2	<i>Síntese do YV-02 e YV-04</i>	58
4.5	Caracterização físico-química dos compostos sintetizados	59
4.5.1	<i>Aparência</i>	59
4.5.2	<i>Solubilidade Aparente</i>	59
4.5.3	<i>Fator de retenção (R_f)</i>	59
4.5.4	<i>Faixa de fusão</i>	60
4.5.5	<i>Rendimento da reação</i>	60
4.5.6	<i>Coeficiente de partição</i>	60
4.6	Caracterização estrutural dos compostos sintetizados	60
4.6.1	<i>Espectroscopia de infravermelho (IV)</i>	60
4.6.2	<i>Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)</i>	61
4.3	Perfil farmacocinético ADME in silico	61
4.7	Avaliação da atividade biológica in vitro	61
4.7.1	<i>Viabilidade celular em cultura de macrófagos J774</i>	62
4.7.2	<i>Avaliação da produção de citocinas e óxido nítrico</i>	62
4.8	Dinâmica Molecular	63
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	65
5.1	Ancoragem molecular	65
5.1.2	<i>Avaliação através de alvos farmacológicos com perfil anti-inflamatório</i>	65
5.2	Síntese e caracterização físico-química	83
5.3	Caracterização estrutural dos compostos sintetizados	88
5.3.1	<i>Análise por espectroscopia no infravermelho</i>	88

5.3.2	<i>Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	94
5.4	Análise do Perfil farmacocinético in silico e druglikeness	96
5.5	Avaliação da atividade biológica in vitro	100
5.6	Simulações de dinâmica molecular (DM)	103
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
	REFERÊNCIAS	110
	APÊNDICE A – Sobreposição da pose de <i>redocking</i> e ligante cocristalizado: COX-2 (A), mPGES-1 (B), NLRP3 (C) e iNOS (D)	117
	ANEXOS A - Capítulo de livro publicado	141

1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória é constituída por mecanismos relacionados à imunidade inata e adaptativa após a ocorrência de estímulos nocivos, como entrada de antígenos, qualquer lesão ou dano de células e tecidos. Alguns eventos desencadeados são: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração celular, indução de enzimas pró-inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , INF- γ etc.) com a função principal de defesa e reparo, sendo observado sintomas agudos típicos como edema, rubor, calor, dor e progressão para a perda de função tecidual. A extensão do processo inflamatório é crucial, visto que pode tornar-se persistente e não resolutive, sendo considerada um fator significativo na patogênese de doenças crônicas (Barnig; Frossard; Levy, 2018; Laurence; Chabner; Knoll-Man, 2012; Rang *et al.*, 2016; Tasneem *et al.*, 2019).

Dentre as doenças inflamatórias crônicas, tem-se a asma que abrange as vias aéreas e possui variações de fenótipo conforme o ambiente, interação genética, origem étnica, idade, sexo, entre outros fatores. Contudo, a forma mais relatada é a asma alérgica, associada às respostas de células T auxiliares (T_H2), que ao reconhecer os alérgenos produzem citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), resultando no acúmulo de eosinófilos, síntese de imunoglobulina E (IgE) e ativação de mastócitos, cuja propagação de eventos envolve a indução de enzimas pró-inflamatórias e liberação de leucotrienos, contribuindo para a hiper-reatividade das vias aéreas, broncoconstrição, produção de muco e remodelação tecidual (Cingi *et al.*, 2015; Hammad; Lambrecht, 2021; Lin; Shi; Ye, 2019; Rang *et al.*, 2016; Trinh *et al.*, 2019).

Diante disso, a classe mais utilizada para as condições inflamatórias são os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) que possuem ação inibitória sobre as isoformas da COX, porém sua atuação não seletiva, sendo associada a efeitos adversos gástricos, devido a inibição da isoforma constitutiva COX-1. Já os fármacos seletivos para a COX-2, apesar de atenuar os efeitos gástricos, ocasionam riscos cardiovasculares (Rao; Knaus, 2008). Ao passo que as principais classes para o tratamento da asma são corticosteroides e agonistas β adrenérgicos, entretanto além do elevado custo, ressalta-se efeitos adversos como tremores e taquicardia induzidos por agonistas β_2 adrenérgicos (tremores, taquicardia etc.) e perda de densidade óssea, hiperglicemia, ganho de peso associados a corticosteroides (Kwah; Peters, 2019; Olin; Wechsler, 2014). Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos direcionados para doenças inflamatórias respiratórias.

Nesse contexto, evidencia-se que o núcleo isatínico apresenta potencial anti-inflamatório e antiasmático, conforme exposto por Kandasamy *et al.* (2010), a isatina foi capaz

de diminuir significativamente a migração de eosinófilos para os pulmões em comparação ao grupo controle no modelo de asma induzido por ovoalbumina em animais, assim como os níveis de citocinas. Segundo Dantas *et al.* (2020), o derivado (Z)-2(5-cloro-2-oxoindolin-3-ilideno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida (COPHCT) demonstrou redução de edema e migração leucocitária nos modelos de edema de pata e bolsão de ar, respectivamente. Ademais, os resultados preliminares dos derivados N-acilhidrazônicos planejados pelo Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF) exibiram inibição da migração leucocitária em modelos de bolsão de ar subcutâneo e asma alérgica induzida por ovalbumina, cujos compostos apresentaram atividade otimizada pela aplicação de estratégias de modificação molecular, como bioisosterismo e expansão molecular (Apolinário, 2016; Silva, 2019).

Em vista da ação anti-inflamatória e antiasmática associada ao núcleo isatínico e derivados N-acilhidrazônicos descrita na literatura, aplicou-se estratégias de hibridação molecular e bioisosterismo pela substituição dos anéis aromáticos seguindo a árvore de decisão de Topliss com o objetivo de avaliar a influência no perfil farmacodinâmico, farmacocinético e toxicológico *in silico* e *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver novos derivados isatínicos hidrazônicos híbridos com potencial atividade anti-inflamatória e antiasmática.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- a) planejar compostos híbridos e realizar estudos *in silico* de ancoragem molecular em alvos envolvidos na fisiopatologia da inflamação e asma;
- b) sintetizar os derivados híbridos, caracterizar suas propriedades físico-químicas e elucidar as estruturas por técnicas espectroscópicas;
- c) analisar o perfil farmacocinético ADME *in silico* e cumprimento dos critérios de *druglikeness*;
- d) verificar a citotoxicidade *in vitro*, através da avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos J774 estimulados por LPS e INF- γ ;
- e) avaliar o potencial anti-inflamatório *in vitro*, por meio da quantificação dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos J774 estimulados por LPS e IFN- γ ;
- f) selecionar os melhores complexos de alvos com atividade antiasmática e anti-inflamatória para avaliação por dinâmica molecular;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Patogênese de doenças inflamatórias respiratórias

O processo inflamatório trata-se de uma cadeia de eventos organizados e dinâmicos que envolvem mecanismos relacionados à imunidade inata e adaptativa após a ocorrência de estímulos nocivos, como infecções, reações imunológicas e lesões teciduais. Após a exposição a patógenos estranhos ou danos teciduais, o sistema imunológico inato é imediatamente ativado em resposta à identificação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que levam ao recrutamento de granulócitos para o tecido lesado para extinguir patógenos, aumentam os níveis de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos). Consequentemente, tem-se a instauração da vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração celular, exsudação de plasma, indução de enzimas pró-inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios, que são refletidos nos sintomas agudos típicos como edema, rubor, calor, dor e progressão para a perda de função tecidual (Abdulkhaleq *et al.*, 2018; Barnig; Frossard; Levy, 2018; Rang *et al.*, 2016).

Os estímulos químicos e físicos funcionam como indutores da resposta inflamatória, ativando a fosfolipase A₂ (PLA₂) (Figura 1) que é responsável pela hidrólise e liberação do ácido araquidônico (AA) a partir dos fosfolipídeos de membrana. O ácido araquidônico é metabolizado em produtos oxigenados através da ação de sistemas enzimáticos, como cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX). As duas isoformas da COX possuem 61% de homologia dos aminoácidos e atuam na oxigenação e ciclização de ácido araquidônico, de modo que a COX-1 é expressa constitutivamente e destinada às funções fisiológicas, como a citoproteção do epitélio gástrico, já a COX-2 é hiper-regulada por citocinas, fatores de crescimento, dentre outros, sendo a principal fonte de produção dos prostanoídes durante o processo inflamatório (Smyth; Grosser; Fitzgerald, 2012).

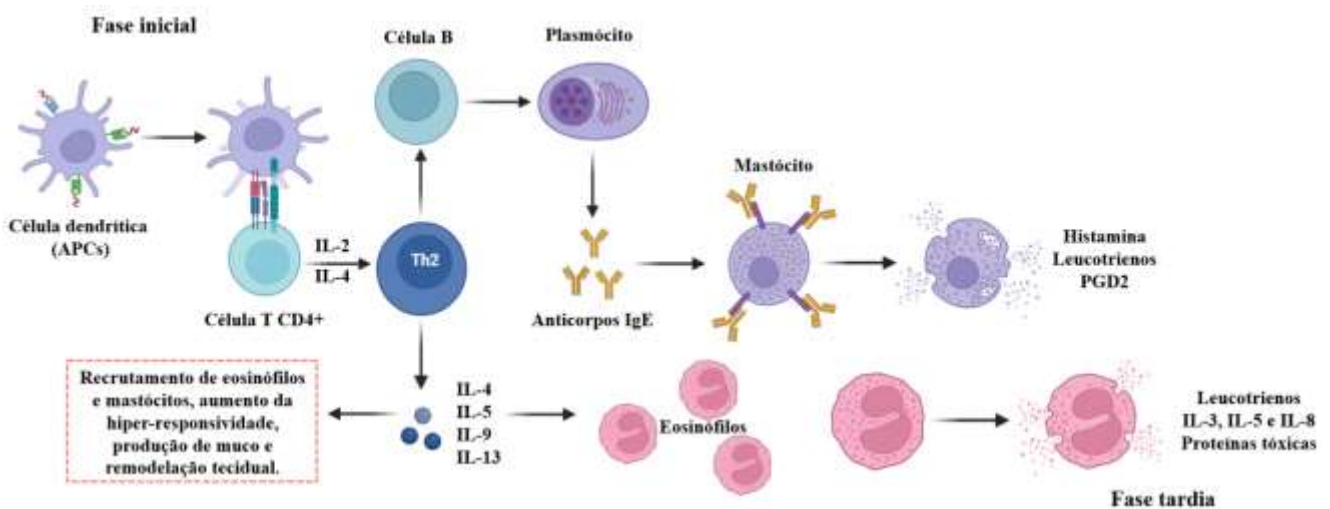
A via COX catalisa a conversão de AA em prostaglandina G₂ (PGG₂) através da introdução de dois átomos de oxigênio nas ligações C-H de AA, seguido por uma rápida redução para prostaglandina H₂ (PGH₂), que é convertida através de isomerases e sintases específicas (PGDS, PGES, PGFS, PGIS e TXS) para originar prostaglandinas (D₂, E₂ e F_{2 α}), prostaciclina (PGI₂) e tromboxano (TxA₂) que possuem os respectivos receptores: DP1-2 (PGD₂), EP1-4 (PGE₂), FP (PGF_{2 α}), IP (PGI₂) e TP (TxA₂) (Ahmadi *et al.*, 2022; Leuti *et al.*, 2020; Rao; Knaus, 2008; Zhang *et al.*, 2022).

contribuir para a migração de linfócitos T (Liu; Yokomizo, 2015; Rang et al, 2016; Smyth; Grosser; Fitzgerald, 2012).

Adicionalmente, como produto da cascata da 5-LOX, os leucotrienos cisteínicos (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) propiciam ação quimiotática para eosinófilos e monócitos, através da interação com o receptor 1 de cisteinil-leucotrienos (CisLT1), também estimulam a produção de citocinas pelos eosinófilos, mastócitos e células dendríticas e aumentam a permeabilidade endotelial, facilitando a migração celular para o tecido atingido (Liu; Yokomizo, 2015; Smyth; Grosser; Fitzgerald, 2012).

A partir de respostas inflamatórias persistentes, tem-se o desenvolvimento de doenças crônicas, como a asma que compromete as vias respiratórias e abrange sintomas como sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse. Essa doença é caracterizada pela hiper-reatividade brônquica, que simboliza uma resposta broncoconstritora exagerada a estímulos que, em situações normais, não causariam qualquer sintoma em indivíduos normais. Assim como, obstrução das vias aéreas, elevada secreção de muco e remodelação. A asma alérgica tem início majoritariamente na infância, sendo associada à repostas mediadas por linfócitos $\text{T}_\text{H}2$ que também é predominante em outras condições alérgicas como rinite alérgica e dermatite atópica (Hammad; Lambrecht, 2021). A seguir na Figura 2, tem-se o mecanismo que constitui a resposta $\text{T}_\text{H}2$.

Figura 2 – Mecanismo $\text{T}_\text{H}2$ e fases da patogênese



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

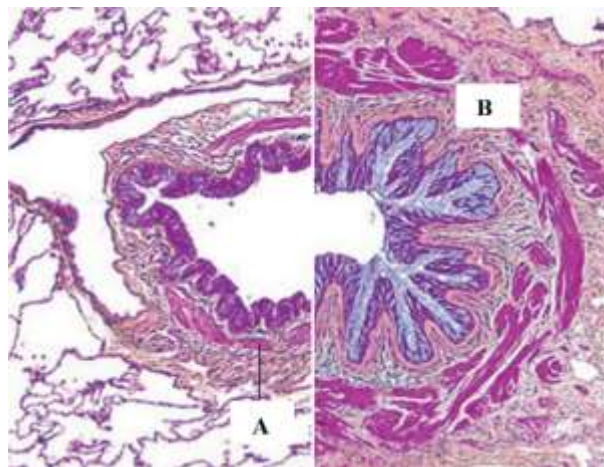
Este mecanismo possui uma fase inicial em que é evidenciada a sensibilização a partir da apresentação do alérgeno pelas células dendríticas que é uma célula sentinela e apresentadora constituinte da imunidade inata. Após a fagocitose e processamento, ela exibe os fragmentos

associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II), realizando essa interação com células TCD4⁺ que direciona a diferenciação em células T_H2 e células B. As células B por sua vez se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos IgE, que ao se ligarem a receptores específicos encontrados em mastócitos ocasionam a liberação de histamina e leucotrienos responsáveis principalmente pelo efeito de broncoconstrição e PGD₂ pela quimiotaxia (Holgate *et al.*, 2015; RanG *et al.*, 2016).

A liberação de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 pelos linfócitos T_H2, gera o recrutamento de eosinófilos e mastócitos, aumento da hiper-reatividade brônquica, produção de muco e remodelação tecidual. A fase tardia é marcada pela infiltração e ativação de leucócitos, em especial, eosinófilos com a liberação de leucotrienos, citocinas com ação quimiotática e proteínas tóxicas que causam danos teciduais (Holgate *et al.*, 2015; Rang *et al.*, 2016).

O processo inflamatório crônico inserido na asma gera variadas alterações patológicas da mucosa, como a hiperplasia epitelial e metaplasia de células caliciformes com aumento da produção de muco. Uma característica histológica da asma é a deposição de colágeno (fibrose) abaixo da membrana basal do epitélio das vias respiratórias, em razão da inflamação eosinofílica, sendo identificado até mesmo no início dos sintomas (Barnes, 2012; Mims, 2015). Por este motivo é observado uma remodelação tecidual nítida na Figura 3 que compara vias aéreas normais (A) e asmática (B), justificando a hiper-reatividade e falta de ar associada à patologia.

Figura 3 – Vias aéreas: (A) Normal (B) Asmática



Fonte: Adaptado de Holgate *et al.* 2015.

3.2 Epidemiologia de doenças inflamatórias respiratórias

Atualmente, as doenças inflamatórias crônicas têm sido reconhecidas como a causa mais significativa de morte no mundo, com mais de 50% de todas as mortes desencadeadas por doenças relacionadas à inflamação (Furman *et al.*, 2019). Dentre estas, as doenças respiratórias crônicas (CRDs) afetam as vias aéreas e outras estruturas dos pulmões. Dentre as mais comuns, tem-se a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, doenças pulmonares ocupacionais e hipertensão pulmonar. Além da fumaça do tabaco, outros fatores de risco incluem poluição do ar, produtos químicos e poeiras ocupacionais e infecções respiratórias inferiores frequentes durante a infância (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023a). As CRDs estão incluídas em dados de Doenças não transmissíveis (DNTs) que por sua vez matam 41 milhões de pessoas a cada ano, equivalente a 74% de todas as mortes globais e na Figura 4 observa-se que o número de mortes atribuídas às CRDs para ambos os sexos em 2019 no mundo variou entre 1.658.290 e 150.752 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023b).

Figura 4 – Número de mortes atribuídas às CRDs para ambos os sexos em 2019 no mundo



Fonte: Who, 2023.

A asma é considerada uma das principais doenças não transmissíveis que afeta crianças e adultos, sendo a doença crônica mais comum entre crianças. Em 2019, foi estimado que 262 milhões de pessoas foram afetadas pela asma e de acordo com a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT) estimou-se que no Brasil existem aproximadamente 20 milhões de asmáticos. A OMS destacou que a asma causou 455.000 mortes em 2019, sendo que a maioria ocorreu em países com baixa e média renda, onde frequentemente a doença é

subdiagnosticada e subtratada, em razão do alto custo associado ao tratamento (SBPT, 2023; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023a).

3.3 Terapia convencional para asma

O tratamento para asma deve ser individualizado e adaptado conforme a necessidade do paciente, com o emprego de medicamentos que controlem sintomas e evitem as crises com ação anti-inflamatória (corticosteroides e antileucotrienos), bem como os medicamentos com ação broncodilatadora para o alívio de sintomas em períodos de exacerbação (SBPT, 2023). Em suma, as classes incluídas no protocolo de tratamento incluem broncodilatadores (agonistas β_2 -adrenérgicos, anticolinérgicos, metilxantinas), corticosteroides, antileucotrienos, e terapia imunomoduladora.

3.3.1 Broncodilatadores

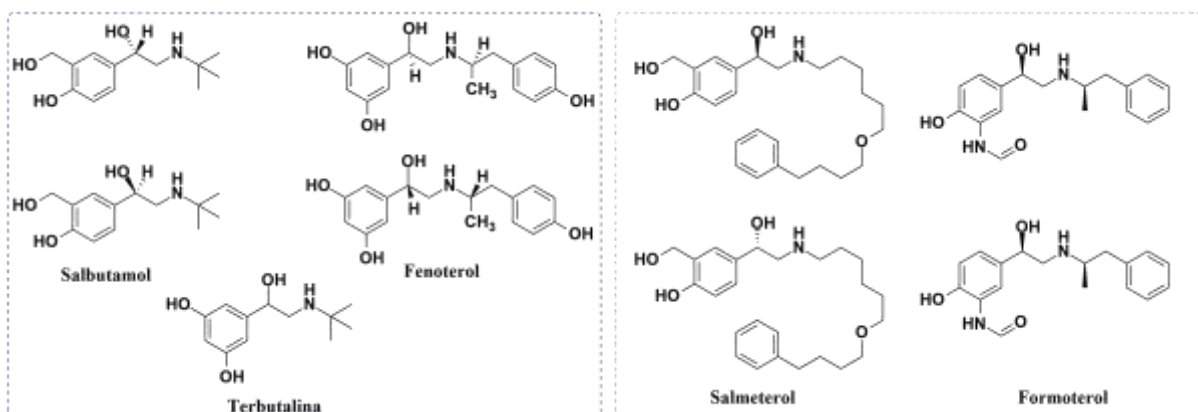
Os fármacos broncodilatadores atuam no relaxamento do músculo liso das vias respiratórias, revertendo de forma imediata a obstrução das vias respiratórias durante eventos de broncoconstrição. As principais classes em uso clínico são os agonistas β_2 -adrenérgicos, agentes anticolinérgicos ou antagonistas dos receptores muscarínicos e metilxantinas como a teofilina (Barnes, 2012; Rang, 2016).

3.3.1.1 Agonistas β_2 -adrenérgicos

Os agonistas β_2 -adrenérgicos foram desenvolvidos com base em substituições na estrutura de catecolaminas (norepinefrina e epinefrina), seu mecanismo de ação envolve a atuação agonista nos receptores β_2 que é acoplado a proteína Gs, resultando na ativação da via de adenilato ciclase, aumento dos níveis de Monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e atividade da fosfolipase A (PLA), inibição da Cinase de Cadeia Leve de Miosina diminuindo os níveis de cálcio, promovendo o relaxamento da musculatura lisa brônquica. Na Figura 5, pode-se observar os agonistas de curta duração (salbutamol, fenoterol, terbutalina) direcionados para o tratamento de asma aguda grave, bem como β_2 -agonistas de longa duração (**LABA**-salmeterol e formoterol) que possuem ação broncodilatadora superior a 12 horas, com administração duas vezes ao dia. Essa classe pode constituir inaladores combinados com

corticosteroides, visto que possuem ações sinérgicas complementares. Adicionalmente, os β_2 -agonistas orais são ocasionalmente indicados como broncodilatadores adicionais, como por exemplo preparações de liberação lenta do salbutamol e bambuterol (Barnes, 2012). Esses fármacos apesar de serem eficazes, apresentam como limitações efeitos colaterais, podendo-se destacar tremores devido a estimulação dos receptores β_2 no músculo esquelético somada a hipopotassemia, taquicardia e palpitações devido a estimulação cardíaca desencadeada pelos receptores β_2 atriais e efeitos metabólicos decorrentes de altas doses sistêmicas (Barnes, 2012; Rang, 2016).

Figura 5 – Estruturas químicas de agonistas β_2 -adrenérgicos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

3.3.1.2 Anticolinérgicos

Os agentes anticolinérgicos são antagonistas competitivos de ligação de acetilcolina a receptores colinérgicos muscarínicos, bloqueando os efeitos da acetilcolina endógena que abrange o efeito constritor direto sobre o músculo liso brônquico mediado através dos receptores do tipo M3 que são ligados a proteína Gq e geram a ativação da fosfolipase C (PLC), seguido da elevação dos níveis de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) e cálcio. Para pacientes asmáticos, os anticolinérgicos têm início de ação mais lento e menor efeito sobre a função pulmonar, quando comparados aos agonistas β_2 , porém são mais recomendados para pacientes idosos portadores da doença devido a existência de um elemento fixo de obstrução das vias respiratórias.

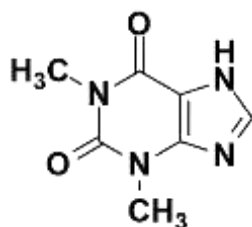
Também podem ser empregados como um broncodilatador adicional em pacientes que necessitam mais que um LABA para tratamento agudo e crônico proporcionando vantagem sobre o aumento da dose de LABA em pacientes que têm efeitos colaterais, além de serem

eficazes na asma aguda grave (Barnes, 2012; Rang, 2016). Os fármacos anticolinérgicos são geralmente bem tolerados quando inalados, porém, ao serem suspensos ocorre aumento no efeito rebote relativo à responsividade das vias respiratórias. E um efeito indesejado significativo é o sabor amargo desagradável do ipratrópio inalado que pode contribuir para a baixa adesão (Barnes, 2012).

3.3.1.3 Metilxantinas

As metilxantinas, como a teofilina (Figura 6) são relacionadas à cafeína e têm sido utilizadas no tratamento da asma desde 1930, a teofilina ainda é amplamente usada nos países em desenvolvimento. Entretanto, a frequência de efeitos colaterais e a relativa baixa eficácia da teofilina ocasionaram redução da sua utilização em muitos países, pois β 2-agonistas inalatórios são muito mais eficazes como broncodilatadores e corticosteroides inalatórios possuem maior efeito anti-inflamatório. O mecanismo de ação pode estar relacionado a inibição não seletiva de fosfodiesterases (PDE), antagonismo do receptor de adenosina, liberação de IL-10 pela inibição de PDE, impedimento da translocação do fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B) no núcleo (inibição de genes inflamatórios), ativação de histona desacetilase, promoção de apoptose nos eosinófilos e neutrófilos (redução de Bcl-2), dentre outros. Os efeitos colaterais mais observados são cefaleia, náuseas, vômitos, aumento da secreção de ácidos, desconforto abdominal, diurese, distúrbios comportamentais, dificuldade de aprendizagem em crianças, arritmias cardíacas e convulsões (Barnes, 2012; Rang, 2016).

Figure 6 – Estrutura química da teofilina



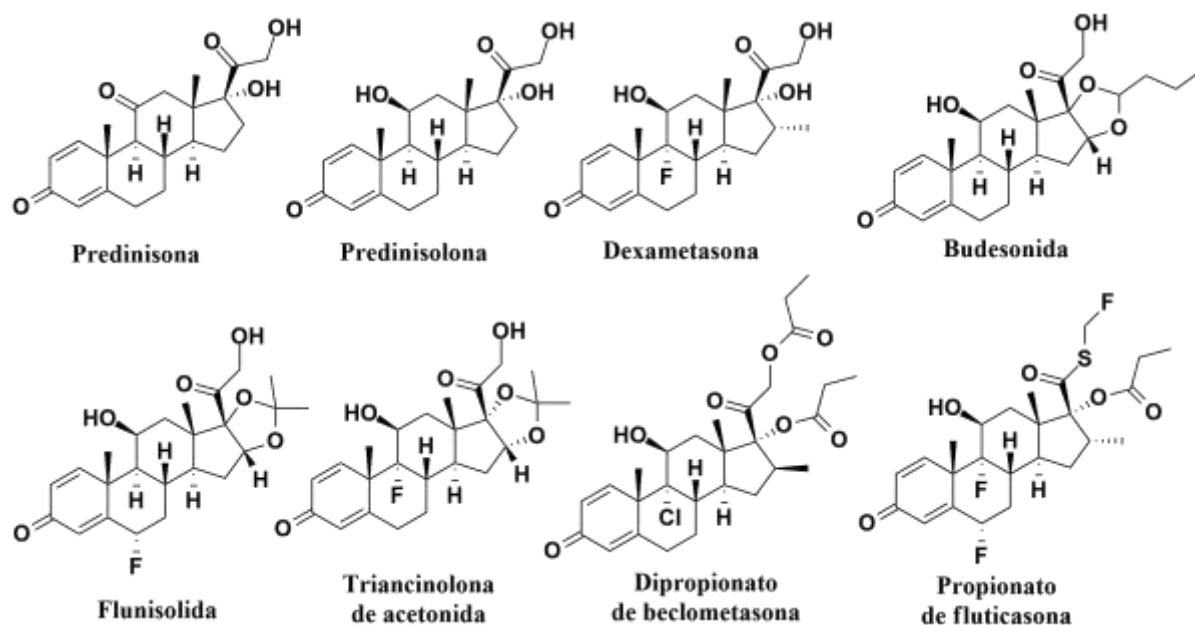
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

3.3.2 Corticosteroides

Os corticosteroides inalados são considerados como terapia de primeira linha em todos os pacientes, exceto aqueles com doença mais branda. Essa classe foi desenvolvida a partir da

modificação da estrutura do cortisol (hidrocortisona) secretado pelo córtex suprarrenal, obtendo os derivados descritos na Figura 7 que podem apresentar administração sistêmica (prednisona, prednisolona e dexametasona) e para uso tópico (beclometasona, triancinolona, flunisolida, budesonida e propionato de fluticasona). Adicionalmente, destaca-se que os fármacos identificados pelo uso tópico, também apresentam efeitos antiasmáticos significativos quando administrados por inalação (Barnes, 2012).

Figura 7 – Estruturas químicas de corticosteroides

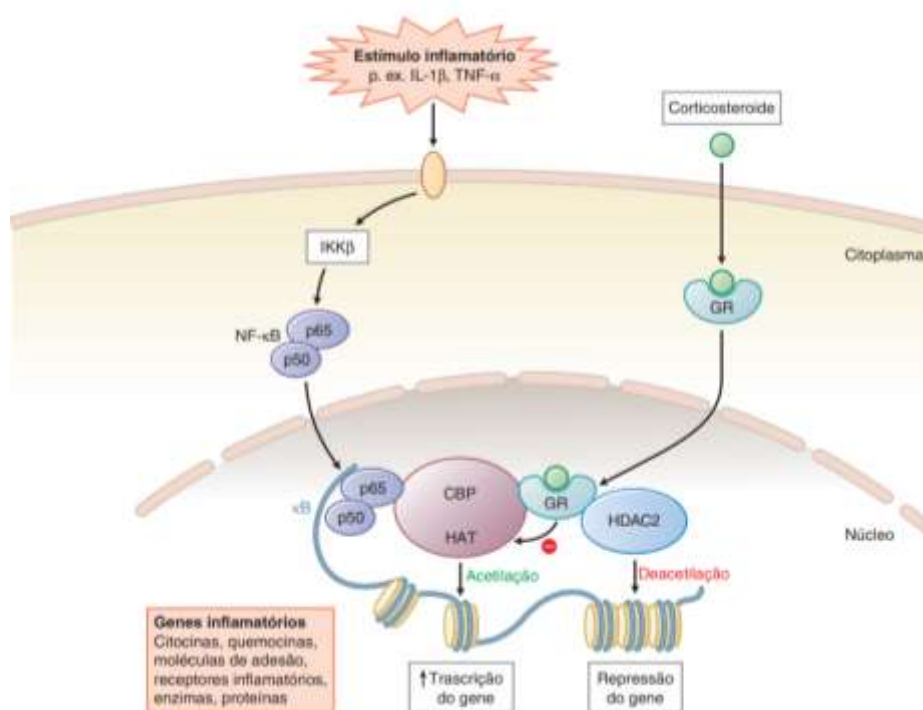


Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

Os corticosteroides entram nas células alvo e se ligam aos receptores glicocorticoides (RG) no citoplasma, como observado na Figura 8. O complexo esteroide-RG é deslocado até o núcleo, conectando-se a sequências específicas nos elementos de determinados genes, como consequência, pode ocorrer o aumento/diminuição da transcrição gênica e subsequente aumento/diminuição da síntese dos produtos gênicos. Também pode ocorrer a interação com fatores de transcrição da proteína e moléculas coativadoras no núcleo, desencadeando a síntese de determinadas proteínas independente de qualquer interação direta com o DNA, logo os corticosteroides atingem seu efeito aumentando a transcrição de vários genes anti-inflamatórios e suprimindo a transcrição de genes inflamatórios. Na Figura 8, é observado que os estímulos inflamatórios resultam na ativação de NFκB, desencadeando a acetilação das histonas do núcleo pela atividade da histona acetiltransferase (HAT) e consequente aumento da expressão dos genes que codificam proteínas inflamatórias. Porém, o complexo esteroide-RG pode inibir a

HAT diretamente e pelo recrutamento de histona deacetilase 2 (HDAC2), que inverte a acetilação de histona levando à supressão de genes inflamatórios ativados (Barnes, 2012).

Figura 8 – Mecanismo de ação anti-inflamatória dos corticosteroides na asma



Fonte: Barnes, 2012.

Desse modo, os corticosteroides inibem a formação de citocinas, como por exemplo, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, TNF- α , fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos, GM-CSF) que são secretados na asma por linfócitos T, macrófagos e mastócitos. Os corticosteroides também diminuem a sobrevivência dos eosinófilos através da indução de apoptose, além de reverter o aumento da permeabilidade vascular que podem gerar edemas, esta classe possui um efeito inibitório direto sobre a secreção da glicoproteína do muco das glândulas da submucosa das vias respiratórias e de forma indireta por inibição de estímulos inflamatórios que estimulam a secreção de muco (Barnes, 2012).

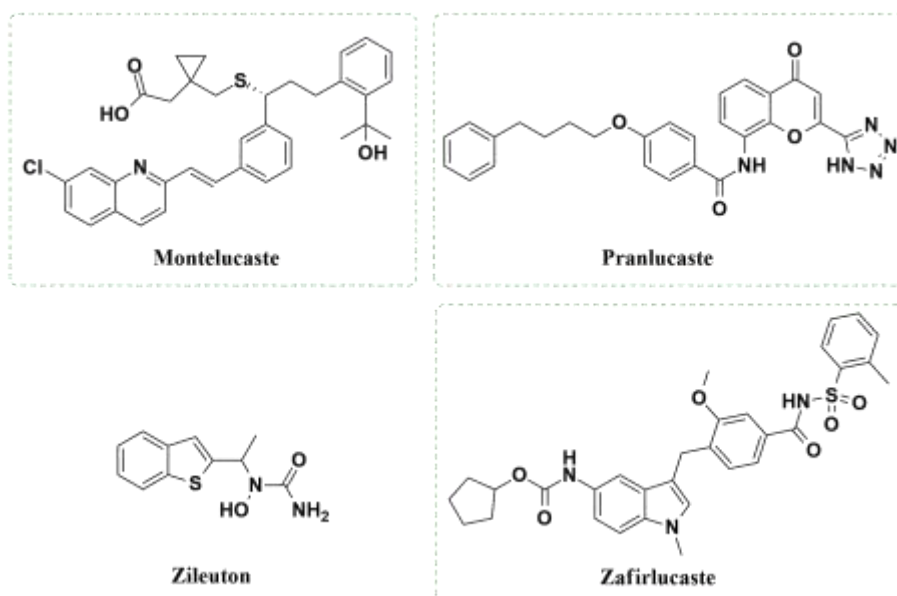
Entretanto, dentre os efeitos colaterais relacionados a terapia de longo prazo com corticosteroide oral tem-se: retenção de líquidos, aumento do apetite, ganho de peso, osteoporose, fragilidade capilar, hipertensão, úlcera péptica, diabetes, catarata e psicose. A frequência dos efeitos colaterais aumenta proporcionalmente com a idade, além disso reações adversas, como anafilaxia, é associada a administração de hidrocortisona intravenosa, principalmente em pacientes asmáticos sensíveis ao ácido acetilsalicílico. Por fim, os corticosteroides inalatórios podem ocasionar efeitos colaterais locais (disfonia, candidíase

orofaríngea, tosse) e sistêmicos como supressão e insuficiência suprarrenais, hematomas, osteoporose, catarata, glaucoma, anormalidades metabólicas, dentre outros (Barnes, 2012; Rang, 2016).

3.3.3 Antileucotrienos

Os cisteinil-leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) produzidos na asma estão associados a efeitos sobre a função das vias respiratórias, como broncoconstrição, hiper-reatividade, exsudação do plasma, secreção de muco e inflamação eosinofílica, acarretando o planejamento de inibidores da enzima 5-LOX (ex. Zileuton – Figura 9) e antagonistas do receptor de cisteinil-leucotrieno 1 (cis-LT1), como o montelucaste, zafirlucaste e pranlucaste (Figura 9).

Figura 9 – Estruturas químicas de antileucotrienos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

Os antileucotrienos são inibidores do receptor cis-LT1 e reduzem essencialmente a ação do LTD_4 , demonstrando melhora significativa na função pulmonar e sintomas associados à asma em pacientes com quadro brando e moderado, reduzindo a utilização de agonistas β_2 inalatórios de resgate. Porém, são considerados menos eficazes que os corticosteroides inalatórios e LABA no tratamento da asma leve e não podem ser empregados como tratamento de primeira escolha, sendo indicados como terapia adjuvante em pacientes que não estão bem controlados. Por fim, ressalta-se casos raros de disfunção hepática relacionada a administração

do zileuton, zafirlucaste e montelukaste, sendo necessário o monitoramento das enzimas hepáticas (Barnes, 2012; Rang, 2016).

3.3.4 Terapia imunomoduladora

A terapia imunomoduladora aplicada à asma abrange a imunossupressão, tratamento com anticorpo monoclonal e imunoterapia específica. A primeira possui representantes como o metotrexato, ciclosporina A e imunoglobulina intravenosa que são vias consideradas quando outros tratamentos não apresentaram efeito, mas os tratamentos imunossupressores são menos eficazes e apresentam maior propensão a efeitos colaterais em comparação aos corticosteroides orais, não sendo rotineiramente recomendados (Barnes, 2012).

Já o tratamento com anticorpo monoclonal demonstra ser mais promissor, tendo como principal exemplo o omalizumabe que reduz os níveis de IgE circulante e bloqueia a ligação da IgE aos receptores de IgE de alta afinidade (FcεR1) nos mastócitos e, assim, impede sua ativação por alérgenos, bem como em receptores de IgE de baixa afinidade (FcεRII, CD23) localizados em outras células inflamatórias, incluindo linfócitos T e B, macrófagos e eosinófilos, visando inibir a inflamação crônica. O omalizumabe é utilizado para o tratamento de pacientes com asma grave, cuja administração ocorre por injeção cutânea a cada 2-4 semanas e sua atuação além de reduzir a necessidade de corticosteroides orais e inalatórios, também diminui as exacerbações da asma (Barnes, 2012; Rang, 2016; Stephenson, 2017).

Vias de citocinas também foram exploradas, podendo-se citar o Mepolizumabe, Reslizumabe e Benralizumabe como exemplos de anticorpos monoclonais que bloqueiam a ligação da IL-5 aos seus receptores presentes na superfície de eosinófilos, e o Lebrikizumabe é um anticorpo focado na inibição da via de sinalização associada a IL-13 através do receptor IL-4α/IL-13α1 heterodímero (Stephenson, 2017).

Por fim, tem-se a imunoterapia alérgênica (AIT) que é um tratamento bem reconhecido para doenças alérgicas, cujo objetivo principal é aumentar a tolerância imunológica através da administração de alérgenos específicos (ex. ácaros da poeira doméstica, pólenes e pêlos de animais) pela via subcutânea (SCIT) e sublingual (SLIT), tendo como alvo as células imunitárias ativadas por alérgenos, como as células Th2 e as células T reguladoras (Treg). Em relação à gravidade da asma, a AIT é classicamente recomendada em pacientes que apresentam asma alérgica intermitente ou persistente, de grau leve a moderado em estado controlado. Um consenso internacional enfatizou que, em caso de asma grave ou não controlada, os pacientes

que iniciam um SCIT ou um SLIT estão em risco de apresentar reações graves, especialmente usando a via subcutânea (Caimmi; Demoly, 2022; Zhang *et al.*, 2018).

3.4 Terapia convencional para doenças inflamatórias

A classe mais utilizada para as condições inflamatórias são os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) que possuem ação inibitória sobre as isoformas da COX e são normalmente agrupados por suas características químicas, sendo classificados quanto a sua seletividade entre as isoformas da COX. O ácido acetilsalicílico (Figura 10) é um AINE não seletivo que atua como analgésico, antipirético e anti-inflamatório e para tal ele realiza uma inibição irreversível através da acetilação dos resíduos de Ser⁵³⁰ (COX-1) ou Ser⁵¹⁶ (COX-2) (Carvalho; Carvalho; Rios-Santos, 2004; Grosser; Smyth; Fitzgerald, 2012).

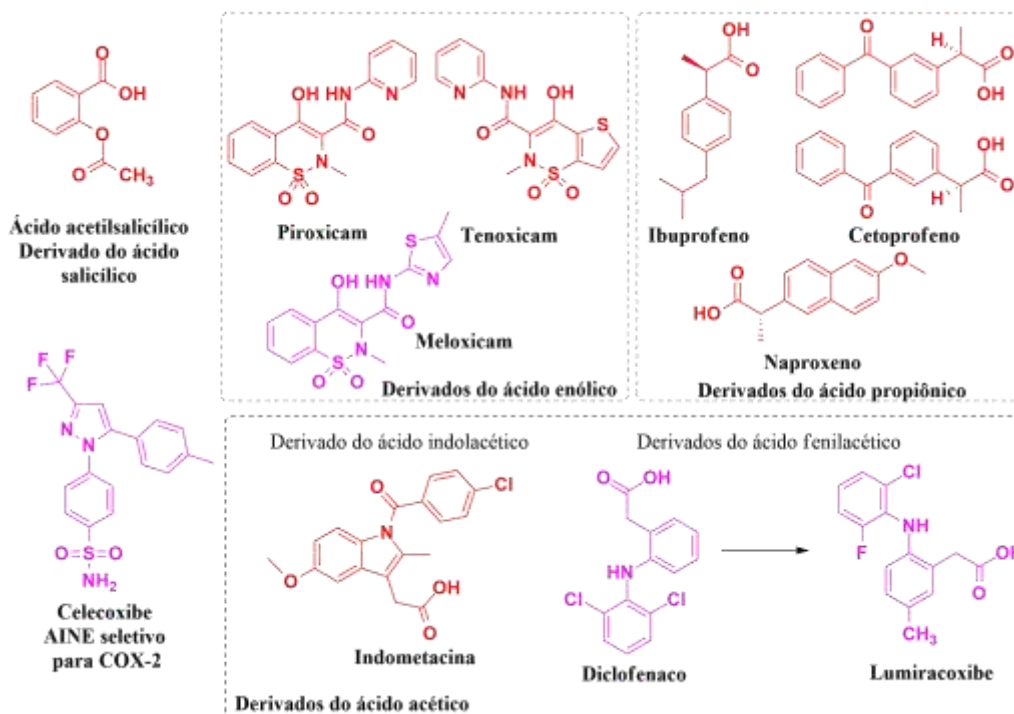
A COX-1 foi descrita como a isoforma constitutiva, devido ao envolvimento no fenômeno da homeostase, citoproteção gastrointestinal, agregação plaquetária e processos relacionados ao fluxo sanguíneo renal, enquanto a COX-2 foi caracterizada como uma isoforma induzível em resposta às citocinas (interferon- γ , TNF- α , IL-1, hormônios, fatores de crescimento e hipóxia) associados a processos patológicos e de adaptação, sendo responsáveis pela percepção da dor e inflamação (Bacchi *et al.*, 2012; Chahal *et al.*, 2023). E por esse motivo AINES não seletivos que inibem a isoforma da COX-1 ocasionam efeitos adversos gastrintestinais, como por exemplo, úlcera gástrica, exacerbação de úlcera péptica, gastrite erosiva, hemorragias e dentre outros (Grosser; Smyth; Fitzgerald, 2012).

Algumas outras classes de AINES não seletivos são (Figura 10): derivados do ácido indolacético (indometacina), derivados do ácido enólico (piroxicam, tenoxicam), derivados do ácido propiônico (ibuprofeno, cetoprofeno e naproxeno). Algumas classes possuem seletividade (Figura 10), como por exemplo, o diclofenaco que é um derivado do ácido fenilacético possui fraca seletividade para COX-2, mas seu análogo, lumiracoxibe, possui elevada seletividade *in vitro* para COX-2. Por fim, tem-se o meloxicam que é um derivado do ácido enólico, mas apresenta seletividade moderada em relação a COX-2 (Grosser; Smyth; Fitzgerald, 2012; Rang *et al.*, 2016).

Tendo em vista a resolução dos efeitos adversos gastrintestinais associados aos AINES não seletivos, foi desenvolvida a classe dos AINES seletivos para COX-2 (Figura 10), cujo principal representante é o celecoxibe que pode ser utilizado para dor aguda, osteoartrose, artrite reumatoide, espondilite anquilosante e dismenorreia primária, porém a inibição seletiva da COX-2 acarreta efeitos cardíacos, dado o desequilíbrio entre TxA₂ protrombótico e PGI₂

antitrombótico, que é responsável por aumentar a possibilidade de um evento cardiovascular trombótico (Grosser; Smyth; Fitzgerald, 2012; Rao; Knaus, 2008; Sinniah; Yazid; Flower, 2021).

Figura 10 – Estruturas químicas dos envolvidos na terapia convencional anti-inflamatória



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

3.5 Alvos com ação anti-inflamatória e antiasmática

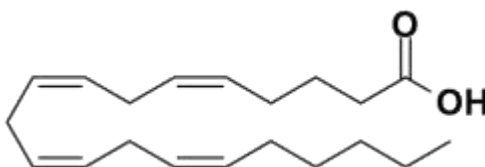
Através do estudo da patogênese de doenças inflamatórias respiratórias é possível distinguir alvos importantes para a continuidade da cadeia envolvida nos mecanismos da resposta inflamatória e desse modo realizar o direcionamento de agentes inibitórios para estes pontos, tendo em vista a construção de um tratamento eficaz. Para o delineamento do perfil anti-inflamatório, a cicloxigenase-2 foi selecionada por ser um alvo bastante explorado na terapia convencional, assim como prostaglandina E sintase 1 microsossomal (m-PGES-1) e domínio pirina da família NLR contendo 3 (NLRP3) como alternativa para a redução de efeitos adversos associados à terapia convencional. Para o perfil antiasmático, evidencia-se o receptor cis-LT1. Adicionalmente, os alvos envolvidos na produção de LTB₄ (5-lipoxigenase e leucotrieno A4 hidrolase) e de óxido nítrico (iNOS-óxido nítrico sintase induzível) estão envolvidos na fisiopatologia de doenças inflamatórias e asma.

3.5.1 Cicloxigenase-2 (COX-2)

As isoformas da COX possuem 61% de homologia dos aminoácidos, logo as estruturas cristalinas da COX-1 e COX-2 são muito semelhantes, cuja alteração da isoleucina (COX-1) por valina (COX-2) na posição 523 cria um “bolso lateral” que pode acomodar grupos relativamente volumosos, por este motivo existem compostos com características específicas, como a presença do grupamento sulfonamida no celecoxibe que garante uma maior seletividade com relação a COX-2. A atividade das enzimas COX consiste em oxigenar e ciclar o ácido araquidônico não esterificado para formar prostaglandina G₂ (PGG₂) e ação da hidropoxidase (HOX) destas enzimas converte a PGG₂ em PGH₂. Em seguida, os intermediários quimicamente instáveis são transformados enzimaticamente nos prostanoídes por ação das isomerases e das sintetases, gerando prostanoídes terminais que são diferenciados pelas substituições em seus anéis de ciclopentano (Rang *et al.*, 2016; Smyth; Grosser; Fitzgerald, 2012).

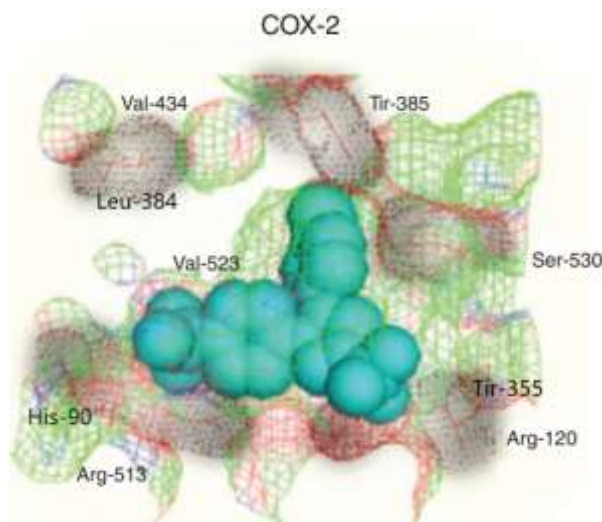
O ácido araquidônico (Figura 11) é o ligante endógeno das isoformas da COX e a partir dele tem-se o início da formação das prostaglandinas, na COX-2 o grupo carboxilato é coordenado pela Arg¹²⁰ e Tyr³⁵⁵ (resíduos posicionados na entrada do sítio ativo), o hidrogênio 13 proS é o mais próximo do resíduo de Tyr³⁸⁵, sendo abstraído e catalisando a formação da PGG₂, além disso destaca-se a formação de ligações de hidrogênio entre o ligante e Arg¹²⁰, Tyr³⁵⁵ e Ser⁵³⁰. Na Figura 12, pode-se observar a representação da COX-2 e destaca-se que a substituição do resíduo Ile⁵²³ da COX-1 por Val⁵²³ permitiu acesso ao bolsão do canal lateral da COX-2, visto que o aminoácido valina possui um menor tamanho e essa substituição também ocorre na posição 434. Outra substituição ocorre entre o resíduo de His⁵¹³ (COX-1) por Arg⁵¹³ (COX-2), alterando o ambiente químico do bolso lateral, devido a presença de uma carga positiva estável que pode ocasionar interações com porções polares dos ligantes (Smith; Dewitt; Garavito, 2000; Vane; Bakhle; Botting, 1998).

Figura 11 – Estrutura química do ácido araquidônico



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

Figura 12 – Representação do alvo farmacológico COX-2



Fonte: Adaptado de Grosser; Smyth; Fitzgerald, 2012.

3.5.2 Prostaglandina E sintase 1 microssomal (mPGES-1)

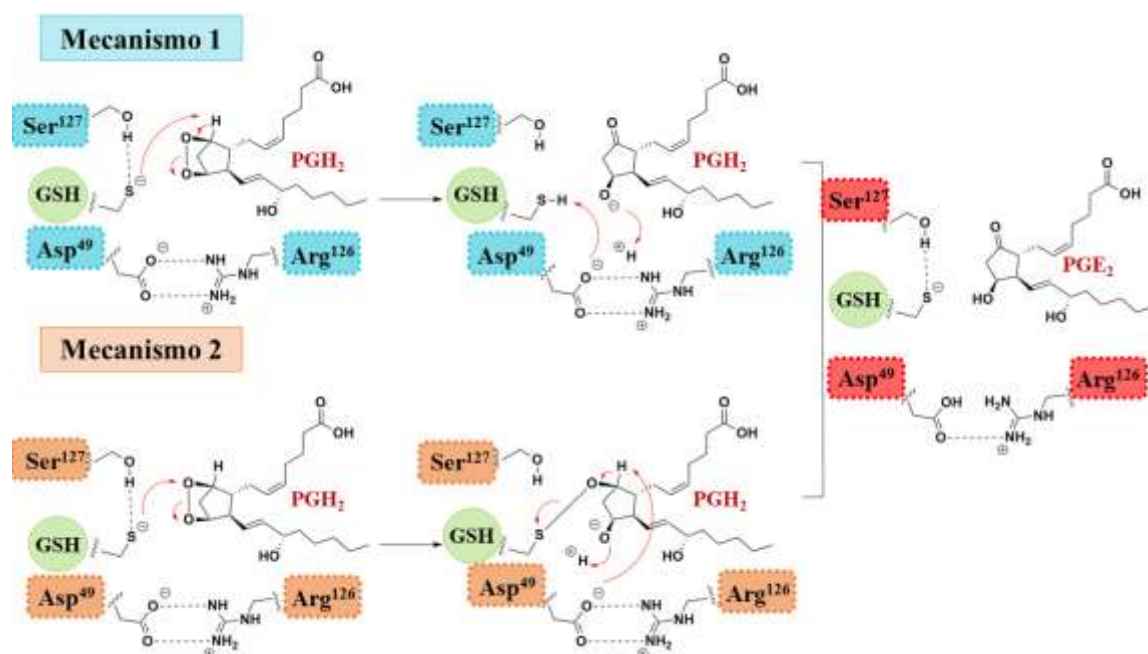
Em razão dos riscos cardiovasculares associados aos inibidores da COX-2, tem-se a opção da sintase 1 microssômica da prostaglandina E (m-PGES-1), que catalisa a isomerização da PGH_2 produzida pela COX em PGE_2 e surgiu como um alvo farmacológico potencial. Visto que a supressão da m-PGES-1 reduz a síntese sistêmica de PGE_2 , que atua em processos inflamatórios crônicos, como artrite reumatoide e miosite, aumentando a biossíntese da PGI_2 por redirecionar o produto do intermediário da COX (PGH_2) para a via da sintase PGI (Jegerschöld *et al.*, 2008; Smyth; Grosser; Fitzgerald, 2012).

A enzima mPGES-1 é uma proteína de membrana homotrímica (152 subunidades de aminoácidos, 16 kDa cada), cuja regulação é feita por estímulos inflamatórios, incluindo $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ e LPS. Pertence à superfamília MAPEG (proteínas associadas à membrana envolvidas no metabolismo de eicosanoides e glutatona) e compartilha homologia de sequência significativa com proteína ativadora de glutatona-S-transferase (GST)-1-like 1 (MGST-1) de 5-lipoxigenase (LOX) (FLAP) e leucotrieno C4 sintase (LTC_4S). Além disso, requer glutatona (GSH) como cofator essencial para sua atividade em um arranjo espacial com formato "U" (Silva *et al.*, 2023a).

No alvo mPGES-1, os resíduos Phe^{44} - Asp^{66} funcionam como um portão para a entrada de GSH no sítio ativo, cujo mecanismo catalítico é associado à desprotonação do cofator GSH e os resíduos de Arg^{126} e Ser^{127} atuam como estabilizadores do grupo tiol de GSH. Como observado na Figura 13, o tiolato pode atuar como base e abstrair o próton na posição 9,

resultando na abertura da ligação do peróxido e formação de um grupo alcoolato na posição 11 protonada, gerando PGE₂. Também pode assumir o papel de nucleófilo e atacar diretamente o peróxido produzindo um sulfeto misto, de forma que a desprotonação na posição 9 é acompanhada pela clivagem da ligação S-O, levando ao alcoolato, depois PGE₂ após uma protonação. Estudos apontaram a importância do Asp⁴⁹ como um acceptor de prótons na posição 9 do PGH₂ ou da sulfidril em ambos os mecanismos descritos, além disso, o Arg¹²⁶ é essencial para o mecanismo catalítico, pois aumenta a basicidade do Asp⁴⁹. Por fim, as interações com GSH no arranjo espacial "U" e os resíduos presentes na entrada do sítio ativo (Thr¹³¹, Leu¹³⁵, Ala¹³⁸, Arg⁵² e His⁵³) são fundamentais para a atividade (Koeberle; Laufer; Werz, 2016; Nascimento; Aquino; Silva Júnior, 2022; Silva *et al.*, 2023a; Sjögren *et al.*, 2013; Thulasingham; Haeggström, 2020).

Figura 13 – Atividade catalítica do alvo mPGES-1 envolvendo dois mecanismos



Fonte: Adaptado de Koeberle, Laufer; Werz, 2016.

3.5.3 Domínio pirina da família NLR contendo 3 (NLRP3)

O inflamassoma NLRP3 é essencial para a defesa do hospedeiro, entretanto, sua ativação anormal pode estar associada a distúrbios hereditários, como síndrome periódica associada à Cryopyrin (CAPS), doenças autoimunes, esclerose múltipla, diabetes tipo 2, doença de Alzheimer e aterosclerose. Este inflamassoma inclui a proteína NLRP3, o adaptador de apoptose associado à proteína *speck-like* contendo um domínio de recrutamento caspase (ASC)

e pro-caspase-1. A proteína NLRP3 em si abrange um domínio de repetição rico em leucina (LRR), um domínio central de ligação a nucleotídeos conhecido como NACHT e um domínio de pirina (PYD). Enquanto a ASC compreende o domínio PYD e um domínio de recrutamento de caspase (CARD), em resposta a estímulos prejudiciais, NLRP3 liga-se a ASC por interações entre os domínios PYDs. Em seguida, a ASC recruta pró-caspase-1 através do CARD para ativar o inflamassoma, levando à clivagem proteolítica de pró-caspase-1 inativa para formar caspase-1, seguida pela conversão de precursores pró-IL-1 β e pró-IL-18 em IL-1 β e IL-18 maduros (Silva *et al.*, 2023b).

Segundo Dekker e colaboradores (2021), o arranjo das estruturas dentro do domínio NACHT propõe que os principais resíduos interagem para estabilizar a conformação inativa. Dentre eles, destaca-se o Arg³⁵¹ que funciona como sensor de γ -fosfato e controla a organização entre domínios. Uma vez que NLRP3 não possui uma forma canônica MHD (Metionina-histidina-aspartato), não há um resíduo de aspartato adjacente a Histidina⁵²² (sensor de β -fosfato), o Arg³⁵¹ e o Glu⁶²⁹ realizam uma interação de ponte salina, dado que a regulação entre domínios antecipa a hidrólise do nucleotídeo, onde a liberação do sensor Arg³⁵¹ de Glu⁶²⁹ é exigida para que coordene o γ -fosfato. Assim, o inibidor cocrystalizado ao alvo NLRP3 (PDB ID: 7ALV) interrompe a interação estabilizadora entre Arg³⁵¹-Glu⁶²⁹ e compensa através de uma ponte para Arg⁵⁷⁸, acompanhado de interações adicionais entre os outros subdomínios. Desse modo, a estabilização mediada pelo inibidor se torna mais forte em comparação aos mecanismos de apo-estabilização, ocasionando uma potente inibição de NLRP3 e manutenção da conformação fechada, que impedem uma possível troca nucleotídica que requer o domínio NACHT em sua conformação aberta.

3.5.4 Óxido nítrico sintase induzível (iNOS)

O óxido nítrico (NO) é um transmissor gasoso lipofílico envolvido na sinalização e regulação de processos fisiológicos, como vasodilatação, relaxamento do muscular liso, neurotransmissão, e diferentes processos inflamatórios. No epitélio respiratório, o NO regula a função mucociliar e frequência ciliar, transporte de íons epiteliais, restauração da disfunção de barreira após lesão por processos de reparo de feridas, e modulação da produção de mediadores inflamatórios no epitélio, contribuindo para a defesa inata do hospedeiro (Bayarri *et al.*, 2021).

A produção de NO é realizada por uma família de enzimas chamadas sintases de óxido nítrico (NOSs) pela oxidação de L-arginina (L-Arg) em L-citrulina. Existem três isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS) que são expressos constitutivamente,

enquanto o terceiro é induzível (iNOS). O nNOS está localizado majoritariamente no sistema nervoso com associação à sinalização neuronal, o eNOS apresenta-se no endotélio, sendo essencial para a vasodilatação e controle da pressão arterial. De forma contrária, o iNOS não está presente constantemente nas células, sendo apenas expresso quando a célula é induzida ou estimulada geralmente por citocinas pró-inflamatórias e resulta na produção de altos níveis de óxido nítrico que é inserido no mecanismo de doenças como asma, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, diabetes do tipo imune, acidente vascular cerebral, câncer, trombose e doenças neurodegenerativas (Cinelli *et al.*, 2020; Garcin *et al.*, 2008).

Ademais, o iNOS é uma proteína de 131 kDa composta por 1.153 aminoácidos, que são reunidos em dois domínios principais, que dispõe de uma redutase C-terminal contendo uma flavina subdomínio de ligação mononucleotídeo (FMN) e uma oxigenase N-terminal. O alvo se apresenta em uma estrutura quaternária homodimérica com ponte de zinco que permite que a enzima converta L-Arginina em L-citrulina com a produção concomitante de NO. Tal transformação é possível através de uma elaborada cadeia de transporte de elétrons que envolve os cofatores nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), mononucleotídeo flavina (FMN), heme e (6R)-5,6,7,8-tetraidropterina (H4B) que são essenciais para esta reação (Cinelli *et al.*, 2020). Dessa forma, na presença de NADPH, próton, H4B e oxigênio, NOS catalisa a geração de NO e L-citrulina a partir da oxidação do substrato natural L-arginina (Dong *et al.*, 2023; Mittal; Kakkar, 2020).

Conforme relatado por Garcin e colaboradores (2008), os resíduos de aminoácidos Gln²⁶³ e Glu³⁷⁷ são essenciais para a atividade inibitória do alvo, dado que as substituições levam a reduções de afinidade de ligação (Kd), principalmente Glu³⁷⁷, cujo Kd variou de 0,4 µM a acima de 100 µM. Além disso, os autores descrevem que os resíduos Tyr³⁴⁷, Arg²⁶⁶, Arg³⁸⁸, Asn²⁸³, Phe²⁸⁶ e Val³⁰⁵ estão envolvidos na inibição do alvo.

3.5.5 5-Lipoxigenase (5-LOX) e leucotrieno A4 hidrolase (LTA₄H)

A enzima 5-LOX é um alvo elegível para o direcionamento de agentes antiasmáticos e anti-inflamatórios. O mecanismo de ação da enzima é catalisado por sua transferência para a membrana nuclear e combinação com a proteína ativadora da 5-LOX (FLAP), que se trata de uma proteína integral da membrana. A FLAP favorece a interação da enzima com o substrato, ácido araquidônico, que se liga ao sítio ativo da enzima constituído por Ile⁴⁰⁶, His³⁷², His⁵⁵⁰, His³⁶⁷, Phe¹⁷⁷ e Gln⁴¹³, desse modo desencadeia o processo de oxigenação do AA em C5 para

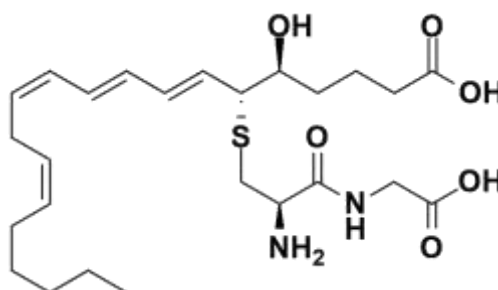
A bestatina é o inibidor cocrystalizado ao alvo e os átomos de oxigênio da carbonila e hidroxila participa de interações no domínio catalítico entre o íon Zn^{2+} que é coordenado por

His²⁹⁵, His²⁹⁹ e Glu³¹⁸. Além disso, os resíduos Glu²⁹⁶ e Tyr³⁸³ que estão implicados na atividade de clivagem peptídica e são próximos do íon Zn²⁺ também interagem com a bestatina. Por fim, os autores mencionaram a presença de um bolsão hidrofílico alocado no sítio de ligação que é constituído por Gln¹³⁴, Asp³⁷⁵ e Tyr²⁶⁷. Caracterizando resíduos de aminoácidos que são importantes para o mecanismo de inibição mediado pela bestatina (Thunnissen; Nordlund; Haeggström, 2001).

3.5.6 Receptor 1 de cisteinil-leucotrienos

O receptor 1 de cisteinil-leucotrienos é acoplado à proteína G e ativado por leucotrienos endógenos que também são conhecidos como leucotrienos cisteínicos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄). Este receptor tem maior afinidade em relação à LTD₄ (Figura 15), sendo predominantemente ativado pela isoforma Gq/11 da subunidade α . Dentro do alvo, a carboxila da porção de glicina de LTD₄ forma uma ponte salina com Arg⁷⁹ e uma ligação de hidrogênio com Tyr¹⁰⁴, enquanto a carboxila do grupo cisteínico se envolve em uma ponte salina adicional e ligações de hidrogênio com Arg²², Tyr²⁶, Tyr⁸³ e Gln²⁷⁴. Outras interações importantes do LTD₄ incluem uma ligação de hidrogênio ao Tyr²⁴⁹, empilhamento com Arg²⁵³ e interações hidrofóbicas com Val¹⁸⁶ e Val²⁷⁷. O cisLT1 é um importante alvo inserido em doenças inflamatórias alérgicas, como asma, rinite alérgica, dermatite atópica e urticária, cujos antagonistas (montelukaste, zafirlucaste e pranlucaste) são utilizados para o tratamento de asma, rinite alérgica e rinosinusite (Luginina *et al.*, 2019).

Figura 15– Estrutura química do LTD₄



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

3.6 Identificação de novos *scaffolds* utilizando ferramentas da química medicinal

3.6.1 Planejamento de fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos é longo, podendo se estender por anos e custar milhões de dólares, envolvendo o desenvolvimento pré-clínico e ensaios clínicos. Existem diferentes abordagens aplicadas à descoberta e desenvolvimento de fármacos, a mais antiga é através da serendipidade que significa uma descoberta por acaso (ex.: penicilina; clordiazepóxido, sildenafil), por modificações químicas de medicamentos conhecidos ou produtos naturais, bem como a triagem de bancos de dados, virtualmente ou por ensaios de alto rendimento (HTS) (Doytchinova, 2022).

Atualmente, o método mais avançado para a descoberta de medicamentos é por meio do desenho racional de medicamentos que representa uma abordagem mais inteligente e barata para a descoberta de novos compostos bioativos (Doytchinova, 2022). O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD – *Computer-aided drug design*) levou à descoberta de mais de 70 medicamentos aprovados, desde o captopril em 1981 até o Remdesivir em 2021. As abordagens principais para o desenho de fármacos são baseadas na estrutura (SBDD – *Structure-based drug design*), no ligante (LBDD – *Ligand-based drug design*) e em fragmentos (FBDD – *Fragment-based drug design*) (Kirsch *et al.*, 2019; Zhang, Yue *et al.*, 2022)

O SBDD necessita da estrutura tridimensional do sítio de ligação para determinar interações entre o ligante e o alvo utilizando ancoragem molecular, triagem virtual e dinâmica molecular, o LBDD é aplicado quando a estrutura tridimensional do alvo é desconhecida e inicia com uma única molécula ou um conjunto de moléculas promissoras frente a um alvo, sendo importante observar as relações estrutura-atividade (SARs) para que as propriedades dos compostos sejam melhoradas a partir do planejamento de análogos apropriados, podendo utilizar modelagem farmacofórica e relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) (Zhang, Yue *et al.*, 2022). Nas últimas décadas a aplicação de FBDD foi crescente, visto que essa abordagem usa as vantagens de métodos biofísicos e bioquímicos para a detecção de fragmentos que são pequenos o suficiente para se ligar a regiões de difícil acesso dentro do alvo, como por exemplo, sítios alostéricos ou pequenos bolsos de ligação essenciais, representando estruturas ideais de ligação como um ponto de partida para otimizações de moléculas (Kirsch *et al.*, 2019).

Atualmente, a inteligência artificial (IA) tem sido aplicada à descoberta de medicamentos em todos os aspectos desse processo, desde a etapa de planejamento de fármacos através da predição da estrutura 3D das proteínas, interações fármaco-proteína, atividade do fármaco e construção de moléculas *de novo*. Na química medicinal, a IA é usada para projetar moléculas específicas assim como fármacos *multitarget*. Além de ser útil na síntese química pela identificação de rotas sintéticas, predição do rendimento da reação, esclarecimento acerca dos mecanismos de reação e por fim, reposicionamento de fármacos. E por esse motivo, as

principais empresas farmacêuticas usam a IA para aumentar a eficácia de seus candidatos a medicamentos com redução do tempo e custos em sínteses e testes desnecessários (Doytchinova, 2022; Zhang, Yue *et al.*, 2022).

3.6.2 Estratégias de modificação e otimização molecular

3.6.2.1 Bioisosterismo

O bioisosterismo é uma estratégia de modificação molecular que se baseia na substituição ou intercambialidade entre fragmentos, átomos e/ou grupos presentes em estruturas de compostos bioativos. Desde que possuam semelhança de volume molecular, forma, distribuição eletrônica e/ou propriedades físico-químicas com aplicação na área da química medicinal durante o processo de desenho racional de novos fármacos. Visando a otimização do potencial farmacodinâmico, perfil farmacocinético e redução de efeitos colaterais ou toxicidade, assim como para superar as barreiras impostas por patentes (Lima; Barreiro, 2005; Lima; Barreiro, 2017).

Algumas contribuições prévias se destacam, como o estabelecimento do princípio de isosterismo por Langmuir em 1919, através do estudo acerca do comportamento químico e reatividade de determinadas substâncias, portando átomos com mesmo número de elétrons de valência. Bem como a “regra do hidreto” formulada por Grimm 1925, que trata da adição de um átomo de hidrogênio com um par de elétrons (hidreto) a um átomo, resultando em um pseudo-átomo que possui as mesmas propriedades físico-químicas daqueles presentes na coluna imediatamente posterior da tabela periódica do átomo inicial. Tal conceito de isosterismo foi ampliado por Erlenmeyer e Hinsberg, passando a envolver átomos, íons ou moléculas que possuíam camadas eletrônicas periféricas idênticas (Lima; Barreiro, 2005; Lima; Barreiro, 2017).

Porém, a utilização do termo “bioisosterismo” teve início apenas durante os anos 1950, por meio de estudos realizados por Friedman e Thornber, em que Friedman notou a importância da aplicação do conceito de isosterismo no desenho de moléculas bioativas, definindo bioisósteros como compostos que se encaixam nos princípios de isosterismo e que exerciam sua atividade biológica em biorreceptores. Posteriormente, Thorbner realizou uma ampliação do termo com o objetivo de englobar subunidades, grupos ou moléculas que exibem propriedades físico-químicas de efeitos biológicos semelhantes. E em 1970, Alfred Burger

dividiu o bioisosterismo em duas categorias: clássico e não clássico, em que a primeira se baseia na camada de valência de átomos, grupos e radicais, incluindo nesta categoria anéis aromáticos ou não, equivalentes, com destaque para o bioisosterismo de anel que é uma estratégia observada frequentemente em classes terapêuticas. Enquanto, estratégias de retroisosterismo, abertura de anel, anelação e equivalência entre grupos funcionais foram enquadradas como não clássico (Barreiro; Fraga, 2008; Lima; Barreiro, 2005; Lima; Barreiro, 2017; Wermuth *et al.*, 2007).

3.6.2.2 Hibridação molecular

A hibridação molecular é uma estratégia de modificação molecular direcionada para ligantes e compostos protótipos que abrange a união de características estruturais de dois compostos bioativos distintos, em uma única nova estrutura, que pode apresentar as atividades de ambas as estruturas originais. Nesse sentido, o novo composto híbrido pode ser dual, misto ou duplo em termos das suas propriedades farmacológicas, representando uma inovação terapêutica relevante para o tratamento de determinadas fisiopatologias de etiologia multifatoriais (Barreiro; Fraga, 2008).

Uma molécula híbrida pode apresentar um espaçador ou não (fundidos) e também podem ser mesclados (quiméricos), como observado na Figura 16. No caso de híbridos interligados, o espaçador precisa ser apropriado estericamente, podem ser âncoras lineares, ramificadas ou dendríticas de natureza hidrofóbica/hidrofílica, a depender do projeto híbrido particular. Outros parâmetros são o comprimento, a flexibilidade e a mobilidade conformacional que influenciam na capacidade de interação (Kumar, Halmuthur M Sampath; Herrmann; Tsogoeva, 2020).

Figura 16 – Representação figurativa dos tipos de híbridos



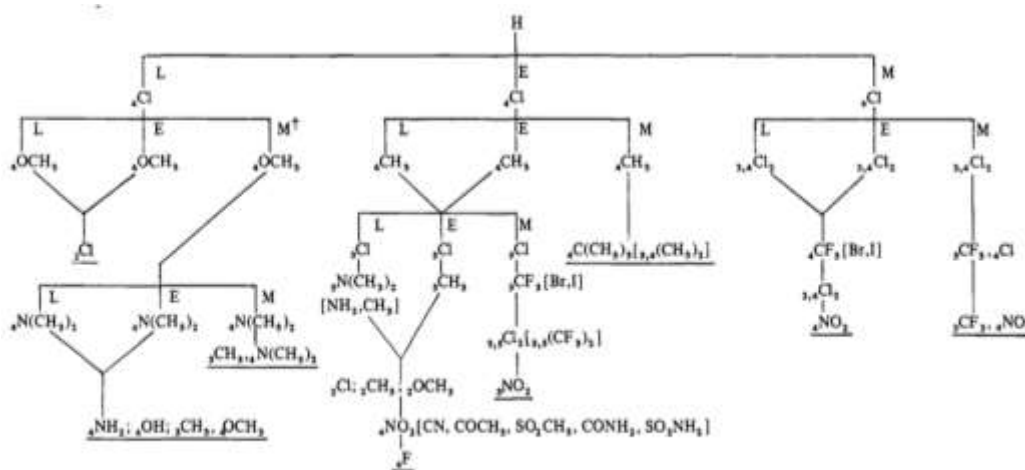
Fonte: Adaptado de Kumar; Herrmann; Tsogoeva, 2020.

3.6.2.3 Árvore de decisão de Topliss

Um problema muito comum no desenho de fármacos é identificar a substituição ideal em um anel de benzeno ou na porção benzenoide de um sistema de anel fundido em um composto *lead* ativo para a elevação de sua potência. Tendo em vista que existem muitos substituintes possíveis e várias posições de anel diferentes, o número de compostos possíveis a considerar contendo até mesmo dois substituintes é muito grande (Topliss, 1972).

Em geral, as abordagens a este problema costumavam ser dependentes da experiência particular e intuição do químico medicinal envolvido, bem como da disponibilidade dos materiais de partida necessários para a síntese. Porém, com o desenvolvimento do método de Topliss (Topliss, 1972), também conhecido como árvore de decisão de Topliss (Figura 17), é possível modificar a estrutura de um protótipo através da introdução de novos grupamentos/substituintes selecionados conforme os princípios de Hansch (Hansch, 1967), baseando-se na análise de QSAR e considerando as contribuições lipofílicas, eletrônicas e estéricas de cada novo possível substituinte.

Figura 17 – Árvore de decisão de Topliss



M= mais ativo, E= equivalente, L= menos ativo

Fonte: Adaptado de Topliss, 1972.

3.6.3 Abordagem computacional

3.6.3.1 Ancoragem molecular

A ancoragem molecular representa uma das ferramentas utilizadas em estudos *in silico*, cuja associação com a biologia molecular possibilita a predição da maneira de interação do candidato a fármaco, sob o ponto de vista molecular, permitindo avaliar o comportamento

destes compostos quando inseridos no sítio ativo do alvo em estudo. Através da análise da conformação e orientação assumida pelos ligantes durante a interação no sítio de ligação são observadas várias possibilidades de “poses” geradas pelos algoritmos, cujo ranqueamento é realizado por meio das funções de *score* (Meng et al., 2011; Pinzi; Rastelli, 2019; Scotti et al., 2017; Torres et al., 2019).

Após o surgimento das primeiras estruturas cristalográficas derivadas de proteínas, compreendeu-se que o desenho racional de fármacos é capaz de mimetizar o processo natural através da ancoragem de ligantes promissores em alvos tridimensionais, fundamentado por SBDD, cuja ligação observada entre moléculas de fármacos e resíduos de aminoácidos do receptor é traduzida num complexo de interação ligante-receptor. As interações intermoleculares mais observadas são ligações iônicas, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, dentre outras que desencadeiam a ativação ou inibição do alvo, além disso a qualidade interativa quando associada aos dados dos estudos realizados em múltiplos alvos de uma doença específica, resulta no direcionamento para os mecanismos moleculares (Amaro et al., 2018; Chen; Seukey; Guo, 2020; Scotti et al., 2017).

3.6.3.2 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) auxiliam na predição do movimento de cada átomo em uma proteína ou outro sistema molecular ao longo do tempo, podendo determinar como as biomoléculas responderão, em nível atômico, às perturbações como mutação, fosforilação, protonação ou adição/remoção de um ligante. Além disso, também podem revelar o comportamento dinâmico das moléculas da água e dos íons de sal, que são geralmente essenciais para a função da proteína e conexão com o ligante (Hollingsworth; Dror, 2018).

Em uma perspectiva qualitativa, as simulações fornecem informações decisivas para o processo de otimização do ligante, podendo ser utilizadas na identificação das principais interações que um ligante desempenha no sítio de ligação, predição de rearranjos induzidos por um ligante etc. Enquanto num nível quantitativo, os métodos baseados em simulação realizam estimativas substancialmente mais precisas de afinidades de ligação de ligantes (energias livres) do que outras abordagens computacionais, como a ancoragem molecular (Hollingsworth; Dror, 2018).

Nesse sentido, as simulações de DM têm sido amplamente utilizadas em combinação com a ancoragem molecular, visando considerar a flexibilidade dos alvos e cálculos de energia

livre de ligação por MM-PBSA ou MM-GBSA também mostraram ser uma boa estratégia para otimizar a precisão da avaliação da capacidade de ligação, visto que a mudança de entalpia em todo o sistema é calculada estatisticamente a partir da energia eletrostática, energia de van der Waals e energia de solvatação, enquanto a mudança de entropia pode ser calculada pela análise de modo normal (Liu, Xuwei *et al.*, 2018).

3.6.3.3 Predição do perfil farmacocinético *in silico* e druglikeness

A segunda causa principal para a falta de eficiência em um fármaco está relacionada com o perfil farmacocinético (Doytchinova, 2022). Por esse motivo, a predição *in silico* do perfil farmacocinético e de toxicidade ADME-Tox (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) está inserido como base para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Tendo em vista que sua aplicação resulta na identificação e suspensão preliminar de fracos candidatos a fármacos, auxiliando na prevenção de falhas nos últimos estágios do processo de desenvolvimento e, com isso, tem-se a redução dos custos e tempo gastos na pesquisa, garantindo simultaneamente a segurança e estabilidade dos fármacos (Alqahtani, 2017; Kar; Leszczynski, 2020).

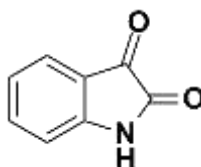
Um composto *drug-like* é descrito como uma molécula que possui grupos funcionais ou propriedades em concordância com a maioria dos fármacos conhecidos e o conceito de *druglikeness* foi introduzido nos primeiros estágios do desenvolvimento de medicamentos com o objetivo de otimizar o perfil farmacocinético e selecionar compostos com propriedades ADME-Tox desejáveis, com ênfase na lipofilicidade, solubilidade, permeabilidade, estabilidade metabólica e afinidade. Algumas regras foram estabelecidas para a seleção de moléculas, como por exemplo, a avaliação de compostos com boa absorção oral descrita na “regra dos cinco” de Lipinski (Lipinski *et al.*, 1997), seguida de outras vertentes desenvolvidas com base nas propriedades moleculares propostas por Ghose, Viswanadhan e Wendoloski (1999), Oprea (2000), Veber *et al.* (2002) e Muegge, Heald e Brittelli (2001).

Outros estudos associados às propriedades ADME-Tox molecular são aplicados para o acesso a toxicidade e perfil farmacocinético de compostos em análise, como por exemplo, a absorção Gastrointestinal (GI), permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE), inibição das enzimas do Citocromo P450 (CYP450), atuação como substrato ou inibidor da Glicoproteína P (P-gp), hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e citotoxicidade (Agoni *et al.*, 2020; Jia *et al.*, 2019).

3.7 Novos scaffolds promissores para a atividade anti-inflamatória e antiasma

A isatina (1*H*-indol-2,3-diona) é um heterocíclico biologicamente ativo que é constituído por um átomo de nitrogênio na posição 1 e duas carbonilas nas posições 2 e 3. Possui dois anéis sendo um de 6 membros e outro de 5 membros, ambos planares como observado na Figura 18, cujos derivados ocorrem naturalmente em plantas, também podem ser localizados no cérebro, fluidos corporais e outros tecidos. Derivados isatínicos apresentam atividade anticâncer, antibacteriana, antifúngica, antidiabética, anticonvulsivante, anti-tuberculose, anti-HIV, neuroprotetor, antioxidante, antimalárico, anti-inflamatório, analgésico, antiasmático, dentre outros relatados na literatura (Kandasamy *et al.*, 2010; Varun; Sonam; Kakkar, 2019).

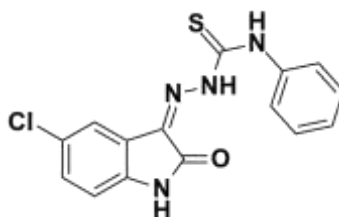
Figura 18 – Estrutura química da isatina



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

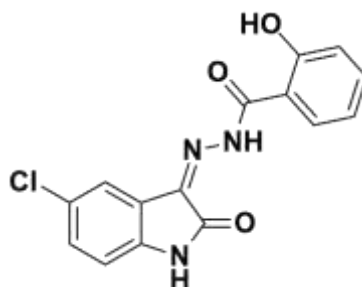
Em um modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina, os animais (BALB/c) foram tratados com isatina encapsulada em nanopartículas de quitosana em uma dose de 50 ou 100 mg/kg, resultando na redução dos níveis de IL-4, IL-5 e TNF- α . Ademais, o estudo histopatológico indicou diminuição da hiperplasia de células caliciformes e da denudação epitelial, a partir do lavado broncoalveolar foi possível realizar a contagem diferencial das células, sinalizando redução do recrutamento de eosinófilos e neutrófilos (Kandasamy *et al.*, 2010).

Tendo em vista seu potencial anti-inflamatório conforme relatado na literatura, Dantas e colaboradores (2020) sintetizaram um derivado isatínico (Z)-2-(5-cloro-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida (composto 1- Figura 19) que apresentou ação anti edematogênica no modelo de edema de pata induzido por carragenina que mimetiza as condições de inflamação aguda. Também evidenciou-se a inibição da migração leucocitária de 55% em uma dose de 1,0 mg/kg ($p < 0,05$) e a dexametasona que foi utilizada como fármaco de referência atingiu 75% de inibição (dose= 2,0 mg/kg; $p < 0,05$) no modelo de bolsão de ar induzido por zymosan.

Figura 19 – Estrutura química do composto 1

Fonte: Dantas *et al*, 2020.

Jarapula *et al.* (2016) sintetizaram um composto clorado de isatina acoplado a uma porção de benzo hidrazida (composto 2) representado na Figura 20, que demonstrou inibição de 65% do edema em uma dose de 100 mg/kg ($p < 0,001$), sendo comparável à redução exibida pela indometacina (68%) em uma dose de 10 mg/kg ($p < 0,001$) no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Figura 20 – Estrutura química do composto 2

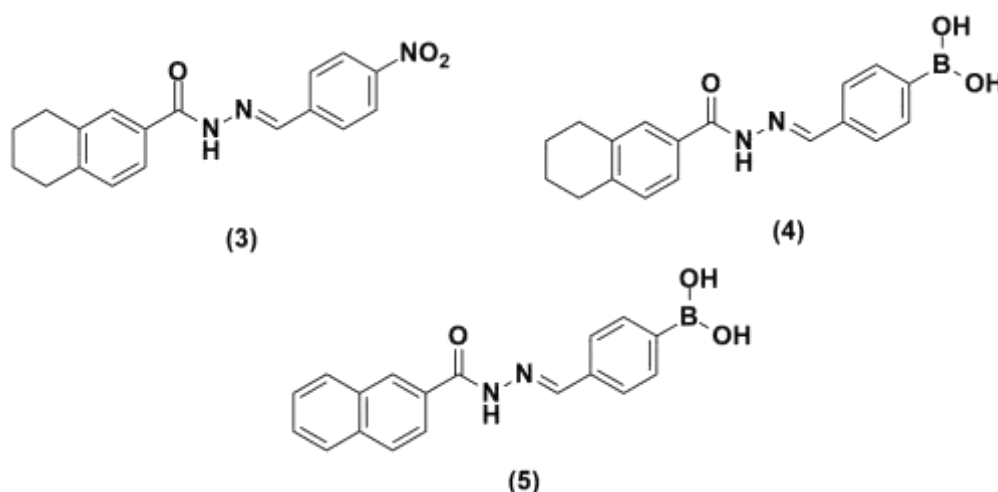
Fonte: Jarapula *et al*, 2016.

Derivados *N*-acilhidrazônicos possuem estruturas amplamente utilizadas na química medicinal em planejamento de fármacos, sendo considerada uma estrutura privilegiada, tendo em vista sua inserção em diferentes compostos com atividade biológica diversa.

Através do modelo de bolsão de ar subcutâneo induzido por carragenina, os derivados *N*-acilhidrazônicos LASSBio-1764 (composto 3) e LASSBio-1763 (composto 4), exibidos na Figura 21, se destacaram pela redução da migração leucocitária de 98% e 96% (dose= 30 mg/kg), atingindo uma DE₅₀ de 1,5 e 2,1 mg/kg, respectivamente. Considerando os eventos clássicos associados à inflamação aguda induzida por carragenina, além da migração celular citada anteriormente, tem-se o aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, proteínas e elevação dos níveis de mediadores da inflamação, a exemplo do óxido nítrico (NO) e citocinas (Cordeiro *et al.*, 2016).

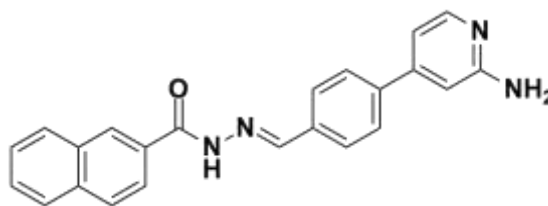
Nesse sentido, os níveis de NO do exsudato foram quantificados, utilizou-se doses de 0,3 , 3 , 10 e 30 mg/kg dos derivados *N*-acilhidrazônicos, que por sua vez reduziram em mais de 65% a produção de NO ($p < 0,05$), com destaque para LASSBio-1760 (composto 5), representado na Figura 21, que realizou inibição de 94% em uma dose de 10 mg/kg e o fármaco de referência dexametasona de 58% (dose= 2,5 mg/kg; $p < 0,05$). Ademais, todos os compostos reduziram os níveis de TNF- α em 95% pelo menos (dose= 30 mg/kg; $p < 0,05$), caracterizando uma correlação entre as vias de sinalização de citocinas pró-inflamatórias e iNOS (Cordeiro *et al.*, 2016).

Figura 21 – Estrutura química dos compostos 3-5



Fonte: Cordeiro *et al.*, 2016.

Dando continuidade à pesquisa, Cordeiro *et al.* (2020) demonstraram que o cloridrato do composto LASSBio-1828 (Figura 22, composto 6) reduziu em quase 50% a migração leucocitária no modelo de bolsão de ar subcutâneo induzido por carragenina e produção de NO em doses de 30 e 100 $\mu\text{mol/kg}$ ($p < 0,05$). Adicionalmente, o LASSBio, como base livre e seu cloridrato, diminuíram os níveis de TNF- α em 50%, porém apenas o cloridrato de LASSBio-1828 reduziu em 90% a secreção de IL-1 β em uma dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ ($p < 0,05$). Tendo em vista os resultados obtidos no modelo *in vivo*, também executaram um estudo *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7 ativados por exposição a lipopolissacarídeos (LPS), demonstrando significativa diminuição dos níveis de NO nas concentrações testadas (0,01, 0,03 e 1 μM) que superou o inibidor da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (IC_{50} = 150 μM), corroborando com as informações expressas pelo modelo *in vivo*.

Figura 22 – Estrutura química do composto 6

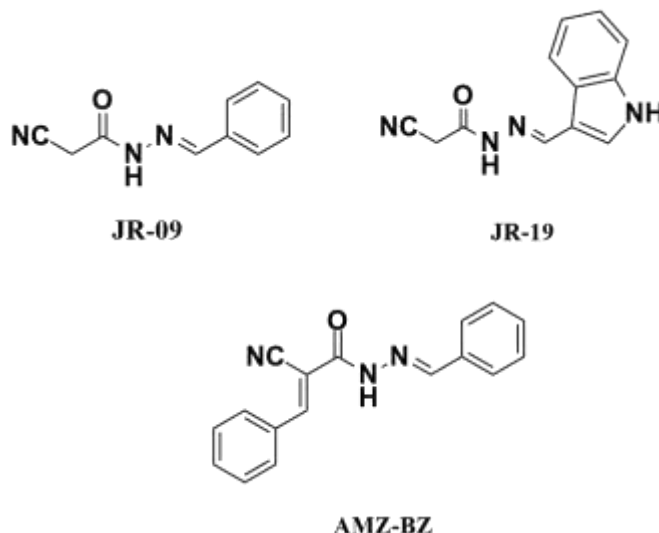
Fonte: Cordeiro *et al.* 2020.

Uma série de derivados *N*-acilhidrazônicos indólicos foram sintetizados e avaliados através do modelo de edema de pata induzido por carragenina, sendo importante a observação da ação inibitória de acordo com o tempo decorrido da administração de carragenina, pois trata-se de um processo bifásico que envolve a liberação de mediadores resultantes do recrutamento iniciado pelos neutrófilos, sendo a fase primária depois de 2 horas e a fase tardia após 6 horas. Dentre os compostos avaliados, o JR-19 (Figura 23) realizou inibição do edema em 88,87% (após 1 hora) e 100% (após 5 horas) com uma dose de 30 mg/kg e metade dessa dose foi necessária para inibir 66,97% do edema após 6 horas da inoculação do agente flogístico, o fármaco usado como referência, indometacina, em uma dose de 10 mg/kg exibiu inibição de 72,43% e 84,07% em 2 e 6 horas, respectivamente (Moraes *et al.*, 2018).

Além disso, o JR-19 demonstrou inibição das isoformas COX-1 e COX-2 com IC₅₀ de 1,54 µM e 1,02 µM, respectivamente, totalizando um índice de seletividade de 1.51 em relação à COX-2, porém com menor potência em relação ao celecoxibe (SI= 11.88). Na avaliação de citotoxicidade *in vitro* frente a macrófagos J774, exibiu CC₅₀ de 150,1 ± 40 µM, tendo como controle positivo a violeta de genciana (CC₅₀= 4,2 ± 0.6 µM). Já no modelo *in vivo* de análise do perfil de toxicidade aguda, o JR-19 não demonstrou efeitos tóxicos em uma dose de 2000 mg/kg (Moraes *et al.*, 2018).

Ressalta-se os resultados preliminares relativos aos derivados *N*-acilhidrazônicos planejados pelo Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF), cujo *scaffold* JR-09 (Figura 23) exibe atuação inibitória sobre a migração de leucócitos em 52%, sendo comparável à indometacina, e seu bioisómero JR-19 (Figura 23) apresentou melhor atividade com 66% de inibição em uma dose de 10 mg/kg no modelo de bolsão de ar subcutâneo (Apolinário, 2016).

Figura 23 – Estruturas químicas dos compostos JR-09, JR-19 e AMZ-BZ



Fonte: Apolinário. 2016.; Silva, 2019.

A partir da expansão molecular aplicada ao JR-09, tem-se o composto AMZ-BZ (Figura 23) que no modelo de asma alérgica induzida por ovoalbumina reduziu o nível de leucócitos com inibição da migração em 69,8%, caracterizando atividade superior ao inibidor de leucotrienos cisteínicos, Montelukaste (66,8%), em uma dose de 10 mg/kg e resposta comparável à dexametasona (inibição de 70,5% com dose= 0,5 mg/kg) em dose mais elevada, sendo preferível aos efeitos adversos inerentes ao uso de corticoides (Rang *et al.*, 2016; Silva, 2019).

Desse modo, tem-se a validação dos *scaffolds* isatínicos e hidrazônicos como potenciais agentes anti-inflamatórios e antiasmáticos, que por sua vez atuam em pontos importantes do processo inflamatório e alérgico. Justificando a aplicação da hibridização como estratégia de modificação molecular no planejamento de fármacos, visando a obtenção de medicamentos com atividade otimizada.

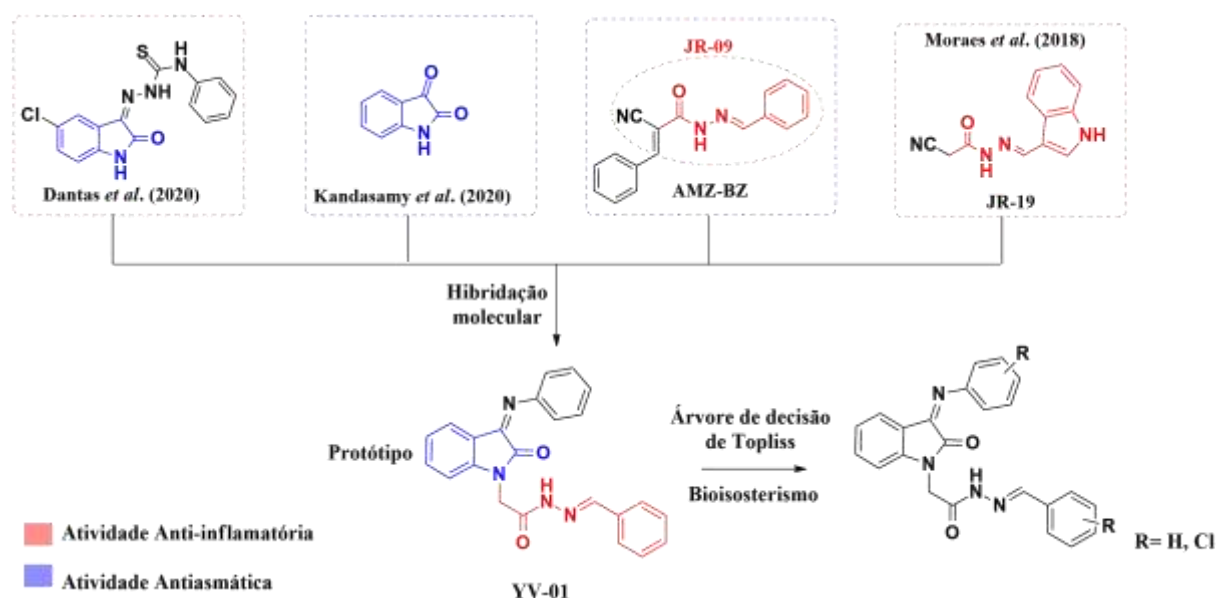
4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento de pesquisa

Tendo em vista a ação anti-inflamatória e antiasmática do núcleo isatínico e derivados *N*-acilhidrazônicos conforme demonstrado na literatura, aplicou-se estratégias de hibridação molecular para a obtenção do protótipo proposto no Esquema 1. Somadas a substituição dos anéis aromáticos de acordo com a árvore de decisão de Topliss por bioisosterismo, visando avaliar a influência no perfil farmacodinâmico, farmacocinético e toxicológico.

A ancoragem molecular foi aplicada para determinar o perfil anti-inflamatório e antiasmático das moléculas planejadas, a partir desse resultado as moléculas foram sintetizadas e caracterizadas, em seguida delineou-se o perfil farmacocinético *in silico* e *druglikeness* para posterior realização dos testes *in vitro*. Por fim, através de dinâmica molecular foi possível confirmar os mecanismos dos alvos *in silico*.

Esquema 1– Planejamento de novos derivados isatínicos hidrazônicos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

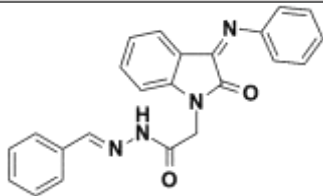
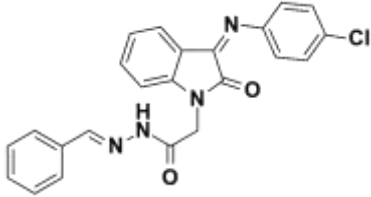
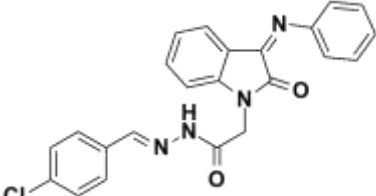
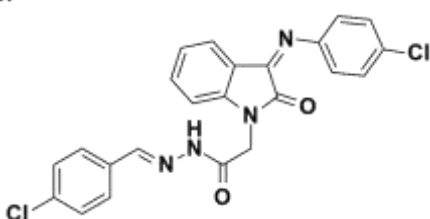
4.2 Ancoragem molecular

Para a realização do estudo *in silico* de ancoragem molecular, as estruturas cristalográficas da cicloxigenase-2 – COX-2 (PDB ID: 5KIR), sintase 1 microssômica da prostaglandina E – mPGES-1 (PDB ID: 5TL9), óxido nítrico sintase induzível – iNOS (PDB

ID: 3E7G), Domínio pirina da família NLR contendo 3 – NLRP3 (PDB ID: 7ALV), 5-lipoxigenase – 5-LOX (PDB ID: 6NCF), leucotrieno A4 hidrolase – LTA₄H (PDB ID: 1HS6) e receptor 1 de cisteinil-leucotrienos – cisLT1 (PDB ID: 6RZ5) foram obtidas a partir do *Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank* (RCSB-PDB) para triagem inicial das moléculas. A ancoragem molecular dos compostos no sítio ativo dos alvos foi realizada utilizando o programa Gold 5.8.1.

As estruturas dos derivados isatínicos hidrazônicos analisadas (Tabela 1) foram desenhadas no MarvinSketch 23.14, com posterior otimização durante a etapa que envolve minimização de energia e análise conformacional por meio da aplicação do método semi-empírico de parametrização PM3, usando o software Arguslab 4.0.1. A validação do estudo foi feita por *redocking* através do ligante cocristalizado, sendo o Desvio Quadrático Médio (RMSD) ≤ 2.0 Å (Bell; Zhang, 2019).

Tabela 1 – Derivados isatínicos hidrazônicos avaliados por ancoragem molecular

Nomenclatura	Estrutura química
YV01 – (E)-N'-benzilideno-2-((Z)-2-oxo-3-(fenilimino)indolin-1-yl)acetohidrazida	
YV02 – (E)-N'-benzilideno-2-((Z)-3-((4-clorofenil)imino)-2-oxoindolin-1-yl)acetohidrazida	
YV03 – (E)-N'-(4-clorobenzilideno)-2-((Z)-2-oxo-3-(fenilimino)indolin-1-yl)acetohidrazida	
YV04 – (E)-N'-(4-clorobenzilideno)-2-((Z)-3-((4-clorofenil)imino)-2-oxoindolin-1-yl)acetohidrazida	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

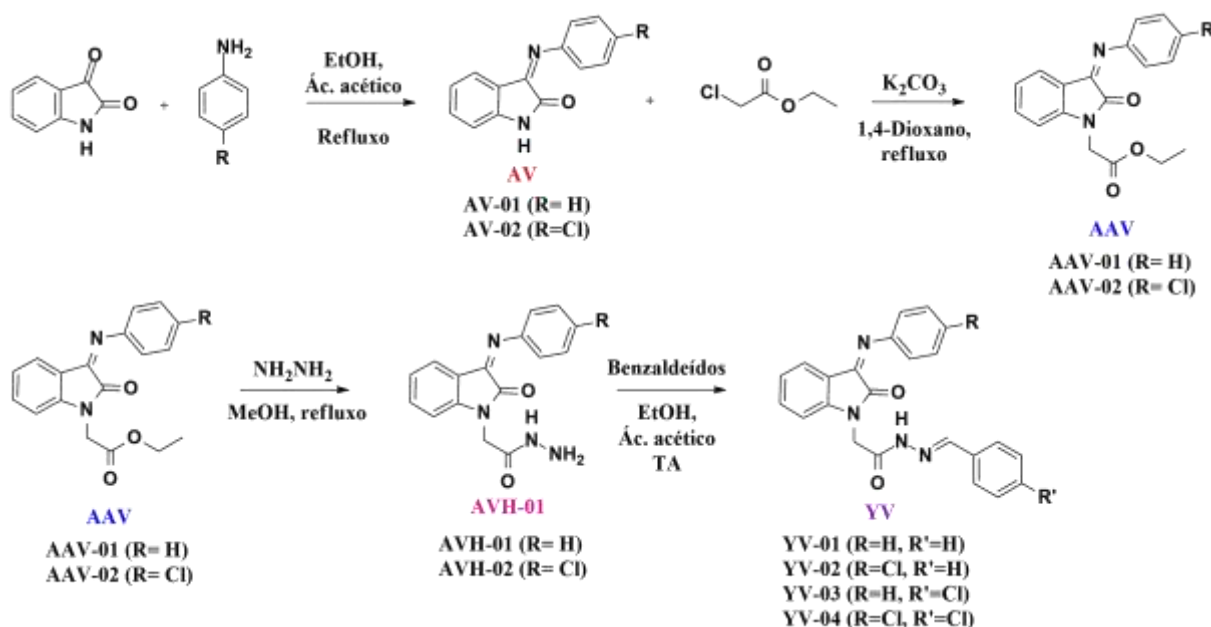
Na modelagem molecular, o receptor é considerado como uma estrutura rígida e os ligantes como flexíveis, assumindo variadas poses, cujos resultados foram analisados a partir

das interações intermoleculares que mensuram a afinidade energética em relação ao alvo, traduzida como o valor de *score* que é fornecido pelo Gold. As conformações ou poses com maior valor de *score* foram avaliadas, utilizando o programa Pymol 1.7.4.5 e para a visualização dos tipos de interações e distâncias aplicou-se o programa Discovery Studio Visualizer 2021 Client.

4.4 Metodologia de síntese dos compostos obtidos

A síntese dos derivados híbridos propostos foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF), conforme as condições da rota sintética linear descrita no Esquema 2. Partindo do núcleo de isatina e através de uma reação de condensação seguida de *N*-alquilação, têm-se os intermediários AAV-01 e AAV-02. Posteriormente, por meio de uma reação de hidrazinação seguida de condensação com benzaldeído e 4-clorobenzaldeído as moléculas finais foram obtidas.

Esquema 2 – Rota sintética para a obtenção dos derivados isatínicos hidrazônicos híbridos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

4.4.1 Síntese dos compostos intermediários

4.4.1.1 Síntese do AV (AV-01 e AV-02)

Para a síntese do intermediário AV-01 foi adicionado 1g de isatina (0,0068 mols) ao balão de fundo redondo, 20 mL de etanol e 3 gotas de ácido acético sob agitação magnética. Após ocorrer a solubilização, foi adicionado 1 equivalente (eq.) de anilina (0,6 mL) à temperatura de 70-80 °C. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e teve duração de 2 horas e após a finalização esfriou à temperatura ambiente, em seguida foi deixada na geladeira *overnight*. No dia seguinte, foi realizada a filtração e recristalização em etanol.

Para a síntese do intermediário AV-02, foram repetidas as condições reacionais utilizadas para AV-01, porém foi adicionado 1 equivalente de 4-cloroanilina (0,8670 g). A reação foi acompanhada por CCDA, teve duração de 26 horas e foi realizado o mesmo tratamento descrito para AV-01.

4.4.1.2 Síntese do AAV (AAV-01 e AAV-02)

Para a síntese do intermediário AAV-01 adicionou-se 0,5 g de AV-01 (0,00225 mols) ao balão de fundo redondo que foi solubilizado em 15 mL de 1,4-dioxano sob agitação magnética, em seguida adicionou-se 3 eq. (0,9314 g) de carbonato de potássio (K_2CO_3) e após solubilizar à 100°C, 4 eq. (1,2688 mL) de cloroacetato de etila foi gotejado lentamente. A reação foi acompanhada por CCDA, teve duração de 2 horas e 30 minutos.

Após a finalização da reação o K_2CO_3 foi filtrado e em seguida realizou-se a rotaevaporação do solvente, obtendo-se um produto de aspecto oleoso. Com auxílio da âmpola de separação, foi feita uma separação do tipo líquido:líquido usando diclorometano como fase orgânica e água destilada como fase aquosa em três repetições, com adição da solução de cloreto de sódio (NaCl) para melhorar a tensão superficial entre as fases. Após o processo de separação, foi adicionado uma quantidade suficiente de sulfato de sódio anidro com o objetivo de adsorver a fase aquosa que ainda estivesse presente. No dia seguinte, o sulfato de sódio anidro foi filtrado e a fase orgânica foi rotaevaporada, obtendo o produto final, cuja secagem foi finalizada na estufa à 40°C.

Para a síntese do intermediário AAV-02, adicionou-se 0,5 g de AV-02 (0,00195 mols) ao balão de fundo redondo que foi solubilizado em 15 mL de 1,4-dioxano sob agitação magnética, em seguida adicionou-se 3 eq. (0,8064 g) de carbonato de potássio (K_2CO_3) e após solubilizar à 100°C, 4 eq. (0,8306 mL) de cloroacetato de etila foi gotejado lentamente. A reação foi acompanhada por CCDA, teve duração de 3 horas, após a finalização da reação o

K_2CO_3 foi filtrado e em seguida realizou-se a rotaevaporação do solvente, observou-se a cristalização do produto, cuja secagem foi finalizada na estufa.

4.4.1.3 Síntese do AVH (AVH-01 e AVH-02)

Para a síntese do AVH-01, adicionou-se 0,726 g de AAV-01 (0,00235 mols) no balão de fundo redondo, o qual foi solubilizado em 10 mL de metanol e mantido em refluxo sob agitação magnética para posterior adição de 10 eq. (0,6323 mL) de hidrazina (50%). A reação foi acompanhada por CCDA, teve duração de 3 horas e após ser resfriado à temperatura ambiente o produto estava precipitado, logo os primeiros cristais foram filtrados e no dia seguinte foram obtidos os segundos cristais.

Para a síntese do AVH-02, adicionou-se 0,5 g de AAV-02 (0,00146 mols) no balão de fundo redondo, o qual foi solubilizado em 12 mL de metanol e mantido em refluxo sob agitação magnética para posterior adição de 10 eq. (0,4674 mL) de hidrazina (50%). A reação foi acompanhada por CCDA, teve duração de 2 horas e 30 minutos, e após ser resfriado à temperatura ambiente o produto estava precipitado, logo os primeiros cristais foram filtrados e no dia seguinte foram obtidos os segundos cristais.

4.4.2 Síntese dos compostos híbridos finais

4.4.2.1 Síntese do YV-01 e YV-03

Para a síntese do YV-01, no balão de fundo redondo foi adicionado 0,1 g de AVH-01 (0,00034 mols), em seguida adicionou-se 12 mL de etanol com posterior acidificação do meio a partir da adição de 3 gotas de ácido acético e por fim, gotejou-se o 1 eq. de benzaldeído (30 μ L) sob agitação magnética à temperatura ambiente (25°C). A reação foi acompanhada por CCDA, teve duração de 28 horas, após a finalização o produto estava precipitado, logo o tratamento aplicado consistiu na sua filtração. Para a síntese do YV-03, as condições reacionais foram repetidas, porém foi adicionado 1 eq. de 4-clorobenzaldeído (0,0477 g), a reação também foi acompanhada por CCDA, teve duração de 31 horas e após sua finalização, o produto foi deixado na geladeira *overnight* para ser filtrado no dia seguinte.

4.4.2.2 Síntese do YV-02 e YV-04

Para a síntese do YV-02, no balão de fundo redondo foi adicionado 0,05 g de AVH-02 (0,00030 mols), em seguida adicionou-se 8 mL de etanol com posterior acidificação do meio a partir da adição de 3 gotas de ácido acético e por fim, gotejou-se o 1 eq. de benzaldeído (15 μ L) sob agitação magnética à temperatura ambiente (25°C). A reação foi acompanhada por CCDA, teve duração de 26 horas e, após a finalização, o produto precipitou através da adição de gelo, sendo, em seguida, filtrado. Para a síntese do YV-04, as condições reacionais foram repetidas, porém foi adicionado 1 eq. de 4-clorobenzaldeído (0,0214 g), a reação também foi acompanhada por CCDA, teve duração de 26 horas e, após a finalização, o produto precipitou através da adição de gelo sendo, em seguida, filtrado.

4.5 Caracterização físico-química dos compostos sintetizados

As moléculas sintetizadas foram avaliadas quanto à aparência, solubilidade aparente, fator de retenção (R_f), faixa de fusão (F.F.), rendimento (%), peso molecular (P.M.) e coeficiente de partição ($\log P$).

4.5.1 Aparência

A avaliação da aparência (cor e textura) dos compostos sintetizados foi realizada de forma macroscópica.

4.5.2 Solubilidade Aparente

A avaliação da solubilidade aparente das moléculas sintetizadas foi realizada frente aos seguintes solventes orgânicos: acetato de etila, acetona, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, DMF, DMSO, etanol, metanol, propanol e tolueno.

4.5.3 Fator de retenção (R_f)

A mensuração do fator de retenção dos compostos sintetizados foi realizada através da técnica CCDA em placas FLUKA Analytical Sílica Gel com espessura de 0,2mm, a partir da comparação das medidas obtidas para os compostos com o sistema eluente predeterminado. As

revelações foram realizadas por meio de câmara de emissão de radiação ultravioleta, Boitton®, em comprimentos de onda ultravioleta 254 e 365 nm.

4.5.4 Faixa de fusão

As faixas de fusão das moléculas sintetizadas foram determinadas por meio da utilização de uma pequena amostra do produto, em um capilar, analisadas através do aparelho Quimis® Modelo Q-340M.

4.5.5 Rendimento da reação

Realizou-se o cálculo do rendimento da reação partindo da pesagem dos compostos finais em uma balança analítica, após a obtenção do valor em gramas foi feita uma conversão para mols. Posteriormente, pela relação entre o número de mols do produto e o número de mols do reagente de partida obteve-se o resultado em porcentagem. Seguem as fórmulas (1) (2):

$$\text{Número de mols}_{\text{produto}} = \frac{m_{\text{produto}}}{PM_{\text{produto}}} \quad (1)$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de mols do produto obtido}}{N^{\circ} \text{ de mols do reagente de partida}} \times 100 \quad (2)$$

4.5.6 Coeficiente de partição

Calculou-se o coeficiente de partição teórico pelo programa ChemDraw 12.0, por meio do desenho das respectivas moléculas.

4.6 Caracterização estrutural dos compostos sintetizados

4.6.1 Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos pela técnica de refletância total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance) na faixa de 4700 a 400 cm⁻¹ em equipamento SHIMADZU, modelo IRspirit-T, com um número de 100 scans e resolução 8. Os resultados foram interpretados através de gráficos plotados no software Origin 8.0.

As análises foram realizadas na Central Multiusuário de Análise e Caracterização Químico-Biológica (CMAC-Quim-Bio), localizada no campus V da Universidade Estadual da Paraíba, sob responsabilidade do Professor Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo.

4.6.2 Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) foram registrados em espectrômetro Bruker Fourier 80 MHz em solução de DMSO deuterado. Os sinais de deslocamento químico (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm) e calibrados em campo baixo para tetrametilsilano ($\delta = 0$). Os resultados foram interpretados através de gráficos plotados no software Mestrenova 14.2.0 e as abreviações de multiplicidade foram descritas com s (simpleto), d (duplete), q (quarteto) e m (multiplete).

As análises foram realizadas na Central Multiusuário de Análise e Caracterização Químico-Biológica (CMAC-Quim-Bio), localizada no campus V da Universidade Estadual da Paraíba, sob responsabilidade do Professor Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo.

4.3 Perfil farmacocinético ADME *in silico*

A realização de estudos preditivos de ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção) foram executados a partir de ferramentas online disponíveis em: <http://www.swissadme.ch/index.php>. Foram avaliados parâmetros como absorção no trato gastrointestinal, solubilidade aquosa (LogS), lipofilicidade (WLogP e MLogP), permeabilidade pela barreira hematoencefálica, metabolismo hepático (inibição de enzimas do citocromo p450) (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Adicionalmente, foi analisado o cumprimento dos critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski (“regra dos 5”) (Lipinski *et al.*, 1997), Ghose (Ghose; Viswanadhan; Wendoloski, 1999); Veber (Veber *et al.*, 2002) e Egan (Egan; Merz.; Baldwin, 2000).

4.7 Avaliação da atividade biológica *in vitro*

As seguintes análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (LAFTE) da Universidade Federal da Bahia, sob responsabilidade da Professora Dra. Cristiane Flora Villarreal.

4.7.1 Preparo das amostras

As substâncias foram diluídas em DMSO 5% para formar uma solução mãe na concentração de 10 μ M, a qual foi mantida congelada e utilizada para diluições posteriores.

4.7.2 Cultura de macrófagos de exsudatos peritoneais

As células de exsudato peritoneal foram obtidas pela lavagem da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss*, com solução salina fria 5 dias após a injeção de tioglicolato a 3% em solução salina (1,5 mL por camundongo) (Espírito-Santo *et al.*, 2017). As células foram lavadas duas vezes com DMEM, ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e 50 μ g/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, Brasil), em placas de cultura de tecidos de 96 poços a 2×10^5 células/0,2 mL por poço. Após 2 horas de incubação a 37°C, as células não aderentes foram removidas por duas lavagens com DMEM. Os macrófagos foram então submetidos ao protocolo de determinação de citotoxicidade e produção de óxido nítrico, conforme descrito a seguir

4.7.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos frente à macrófagos

Inicialmente, os macrófagos (2×10^5 células/poço) foram incubados em placas de 96 poços, em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 50 μ g/ml de gentamicina, em triplicatas e estimulados com lipopolissacarídeo (LPS 500 ng/mL, *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma) e IFN- γ (5 ng/mL, Sigma). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, *overnight* para adesão à placa (Opretzka *et al.*, 2019). As substâncias, ou veículo, foram adicionadas às placas em dez concentrações variando de 0,9 – 500 μ M em triplicata, e as placas foram incubadas por 72 horas, utilizando Triton 5% como controle positivo. Em seguida, adicionou-se 20 μ L / poço de Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA) às placas, após 6 horas, as leituras colorimétricas foram realizadas a 570 e 600 nm. As amostras foram avaliadas segundo ANOVA one-way seguida do pós-teste de Tukey, com nível de significância de *p<0,05.

4.7.4 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos estimulados com LPS+ INF- γ

Para a determinação dos níveis de óxido nítrico, as células foram semeadas em placas de 96 poços (2 x 10⁵ células/poço) em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 50 mg/ml de gentamicina durante 2h a 37 °C e 5% CO₂. As células foram estimuladas com LPS (500 ng / mL) + IFN- γ (5 ng / mL) na presença dos compostos em oito concentrações (0,9 a 125 μ M), veículo ou dexametasona 10 μ M (padrão ouro), e incubadas a 37 °C. Os sobrenadantes livres de células foram coletados 24 horas após para quantificação de nitrito, sendo então mantido a -80 °C até o momento do ensaio. A quantificação de nitrito nas amostras, indicativo dos teores de óxido nítrico, foi realizada pelo método de Griess (Green, 1982). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Spectramax), com filtro de 570 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1. Os resultados foram expressos em μ M de nitrito, tendo por base uma curva padrão de nitrito de sódio com concentração inicial de 400 μ M (Espírito-Santo *et al.*, 2017). As amostras foram avaliadas segundo ANOVA one-way seguida do pós-teste de Tukey, com nível de significância de *p<0,05.

4.8 Dinâmica Molecular

Os melhores complexos com atividade anti-inflamatória e antiasmática foram selecionados para a análise por meio de dinâmica molecular.

O procedimento de dinâmica molecular foi realizado através do software GROMACS®, em que as moléculas de água cocrystalizadas foram removidas, e adicionados os átomos de hidrogênio. E então foi utilizado o campo de força CHARMM36, adicionando a enzima em uma caixa cúbica de 1 nm em condições fisiológicas neutras. Em seguida, foram adicionadas moléculas de água e íons de sódio pelo método SPC (Single Point Charge) para a distribuição das moléculas através do sistema. Após o sistema solvatado e montado, é necessário garantir que não ocorrerão problemas estéricos e nem geometria inadequada, sendo necessária uma minimização da energia do sistema. Logo após a minimização, solvente e íons foram equilibrados ao redor da proteína. Esse equilíbrio foi conduzido em duas fases: NVT (Número de partículas, volume e temperatura constante) e NPT (Número de partículas, pressão e temperatura constante) com uma temperatura de 300K e pressão de 1 bar a 100 ps. Após equilibrar o sistema à temperatura e pressão desejados, foi executada a simulação dinâmica à 100 ns.

Ao finalizar a simulação, foram gerados gráficos de RMSD, flutuação quadrática média (RMSF), raio de giro (Rg), superfície acessível a solventes (SASA) e de ligações de hidrogênio através do software Xmgrace®, sendo comprovada a estabilidade da enzima nas condições

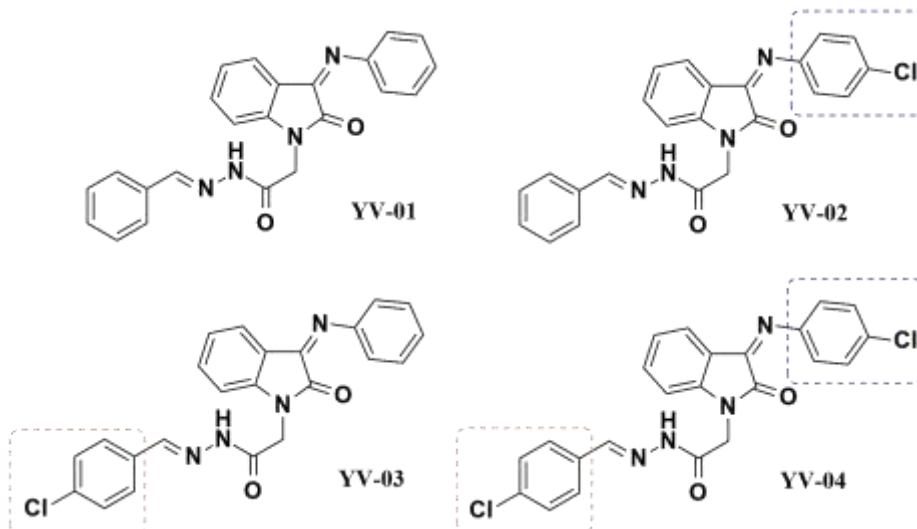
propostas pela simulação. Após a simulação da dinâmica molecular, foi realizada uma análise dos clusters do arquivo gerado pela dinâmica através do software Chimera®, resultando na seleção daquele que apresentará maior representatividade. Por fim, foi realizada a validação da dinâmica molecular através da obtenção do gráfico de Ramachandran por meio do SAVES® para comprovação da qualidade do modelo gerado.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Ancoragem molecular

Os derivados híbridos isatínicos hidrazônicos exibidos na Figura 24 apresentam semelhanças e diferenças entre si. Mais especificamente, o YV-01 que não possui substituinte exibe as regiões 3-fenilimino e *N*-benzilidenoacilhidrazona semelhantes ao YV-03 e YV-02, respectivamente, porém a diferença consiste na presença de um átomo de cloro de forma alternada nessas regiões para estes compostos, enquanto o YV-04 possui esses pontos do *scaffold* clorados. Além de avaliar o potencial da molécula, também foi considerada a influência dessas porções quanto ao perfil anti-inflamatório e antiasmático através de ancoragem molecular.

Figura 24– Compostos híbridos isatínicos hidrazônicos planejados



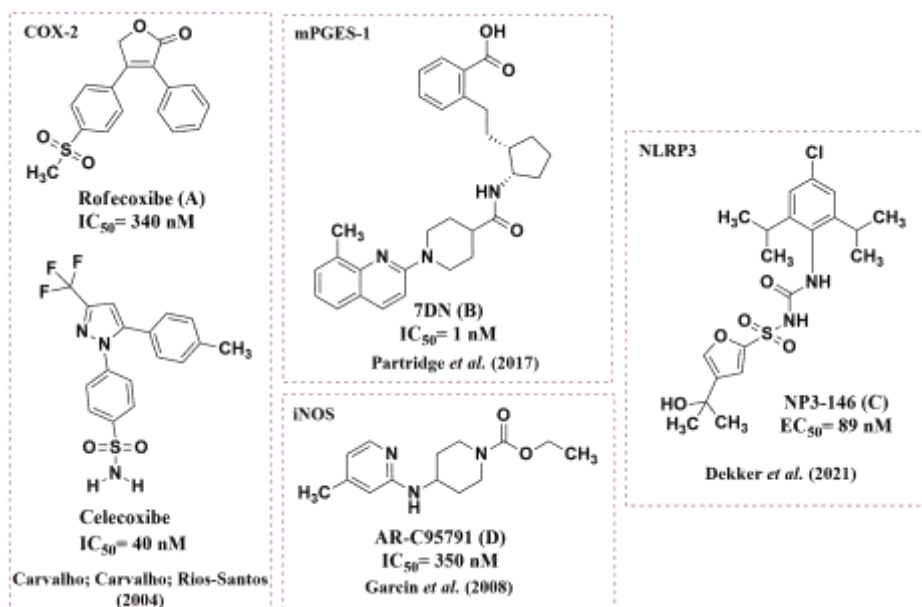
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

5.1.2 Avaliação através de alvos farmacológicos com perfil anti-inflamatório e antiasmático

Foram selecionados alvos farmacológicos com perfil anti-inflamatório, iniciando com a COX-2, que é a isoforma induzida durante o processo inflamatório, e possui como ligante cocrystalizado o inibidor rofecoxibe, o celecoxibe também foi adicionado à avaliação. Os alvos mPGES-1, NLRP3 são relevantes devido a redução dos efeitos adversos associados à inibição das isoformas COX. Por fim, a inibição do alvo iNOS é essencial para o perfil anti-inflamatório, bem como possui uma contribuição para ação antiasmática conforme descrito na literatura. Na

Figura 25, tem-se os ligantes cocrystalizados aos alvos selecionados e na Tabela 2 os valores de *score* relativos à ancoragem molecular com numeração das poses específicas assumidas pelos compostos entre parênteses. O *score* representa a quantificação da afinidade dos compostos dentro do alvo pelo estabelecimento de interações intermoleculares. Adicionalmente, a Tabela 2 destaca que todos os ligantes cocrystalizados apresentaram RMSD abaixo de 2.0 Å no *redocking*, validando o método.

Figura 25 – Ligantes cocrystalizados a COX-2 (A), mPGES-1 (B), NLRP3 (C) e iNOS (D)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

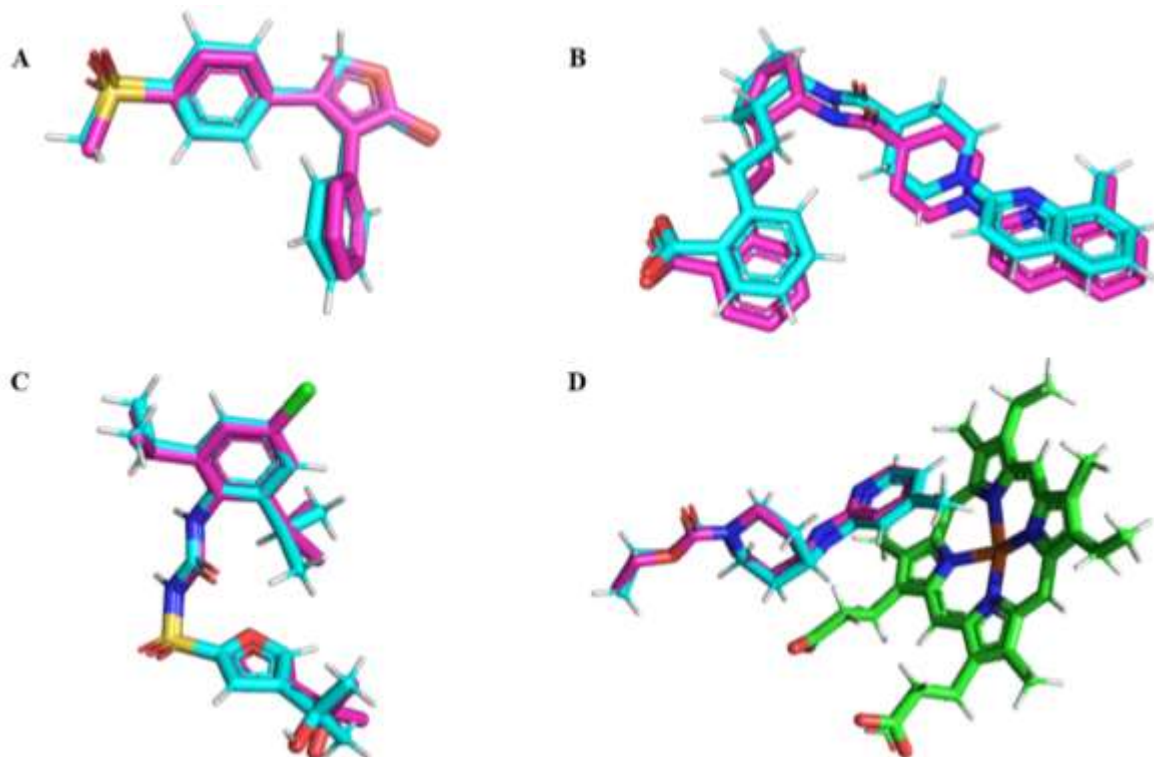
Tabela 2 – Valores de *score* relativos à ancoragem molecular com perfil anti-inflamatório

	COX -2 (5KIR)	mPGES-1 (5TL9)	NLPR3 (7ALV)	iNOS (3E7G)
YV-01	63.4974 (3)	55.4147 (2)	70.3379 (95)	81.8922 (100)
YV-02	61.4673 (30)	59.4147 (16)	68.8636 (45) 68.2781 (19) 68.0929 (72)	81.7176 (14)
YV-03	71.1271 (21) 70.1821 (9)	56.3217 (100)	71.6709 (48)	76.1623 (9)
YV-04	60.4142 (46)	59.0041 (3)	72.2505 (49)	77.2181 (3)
Celecoxibe	95.7182 (21)	–	–	–
Ligante cocrystalizado	75.5304 (97)	51.0602 (98)	70.7469 (23)	82.3597 (125)
RMSD	0.3404	1.0369	0.4821	0.3297

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Com demonstração da pose do ligante cocrystalizado em rosa sobreposta à pose resultante do *redocking* em azul na figura 26 a seguir.

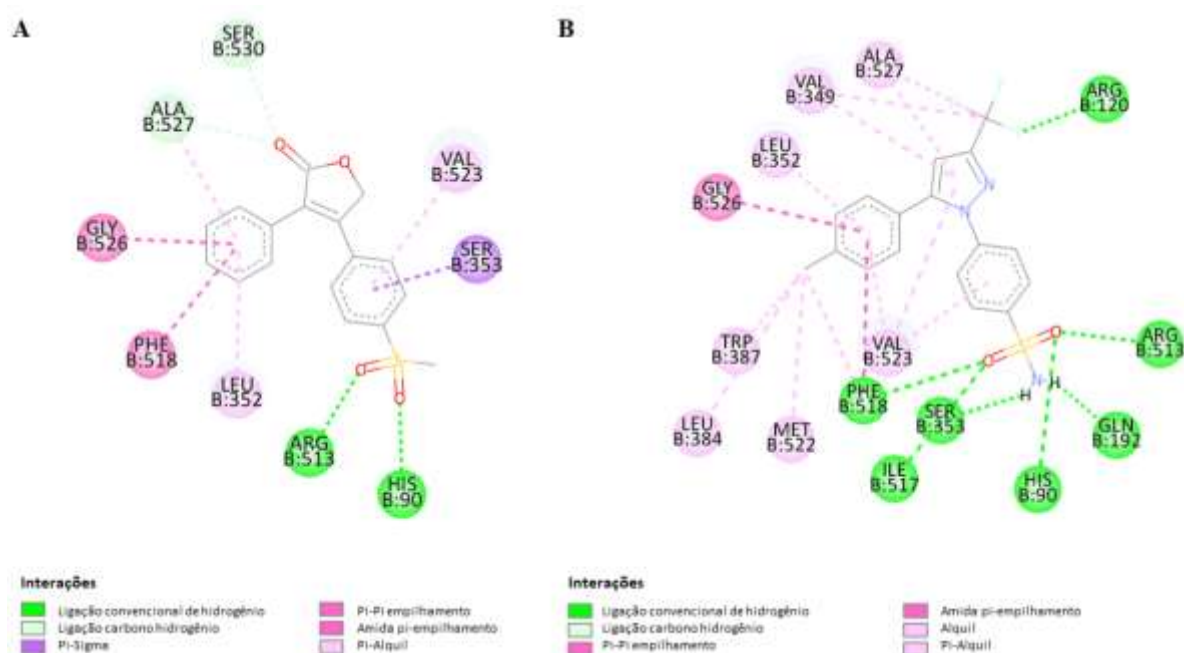
Figura 26 – Sobreposição da pose de *redocking* e ligante cocrystalizado: COX-2 (A), mPGES-1 (B), NLRP3 (C) e iNOS (D)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Na Figura 27, tem-se a representação das interações realizadas pelo ligante cocrystalizado ao alvo COX-2, rofecoxibe. Foram observadas ligações de hidrogênio com o bolso lateral (Arg⁵¹³ e His⁹⁰), Ser⁵³⁰ e Ala⁵²⁷, bem como interações de transferência de carga (Ser³⁵³, Phe⁵¹⁸ e Gly⁵²⁶) e hidrofóbicas (Val⁵²³ e Leu³⁵²), resultando em um *score* de 75.5304. Tendo em vista a maior seletividade atribuída ao celecoxibe frente a COX-2, este fármaco também foi avaliado (Figura 26) e obteve um *score* superior de 95.7182, devido a maior quantidade de ligações de hidrogênio (Arg¹²⁰, Arg⁵¹³, His⁹⁰, Gln¹⁹², Ser³⁵³, Ile⁵¹⁷, Phe⁵¹⁸) inclusive com o resíduo Arg¹²⁰ localizado na entrada do sítio, interações de transferência de carga e hidrofóbicas com Trp³⁸⁷, Leu³⁸⁴, Met⁵²², Val⁵²³, Leu³⁵², Val³⁴⁹, Ala⁵²⁷ e Gly⁵²⁶.

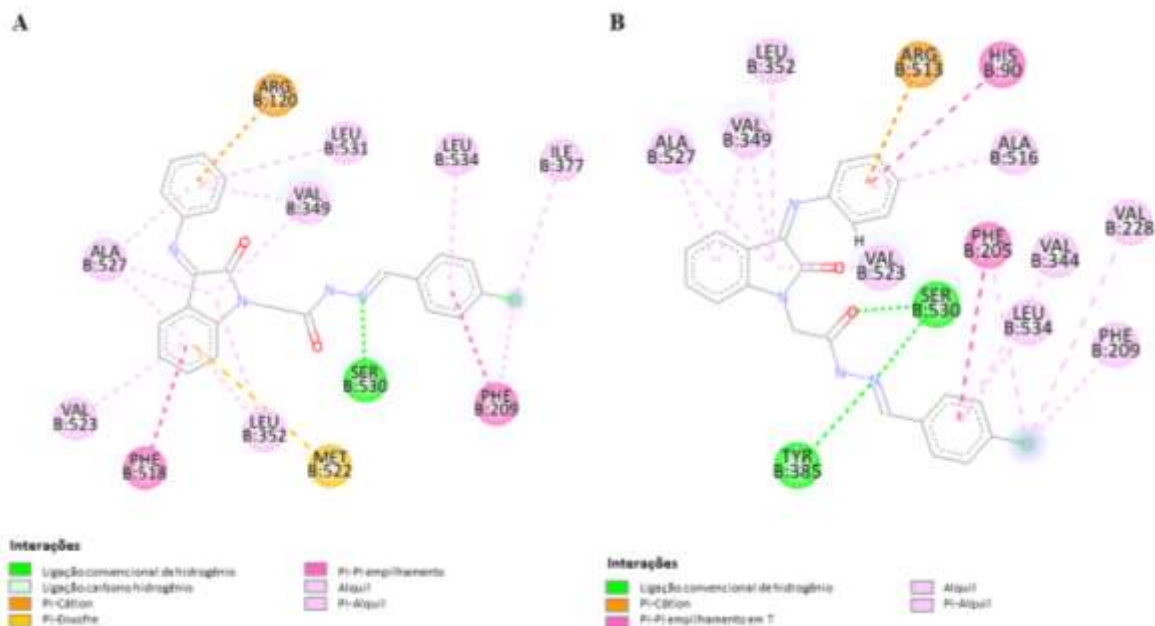
Figura 27 – Representação das interações do Rofecoxibe (A) e Celecoxibe (B) na COX-2



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

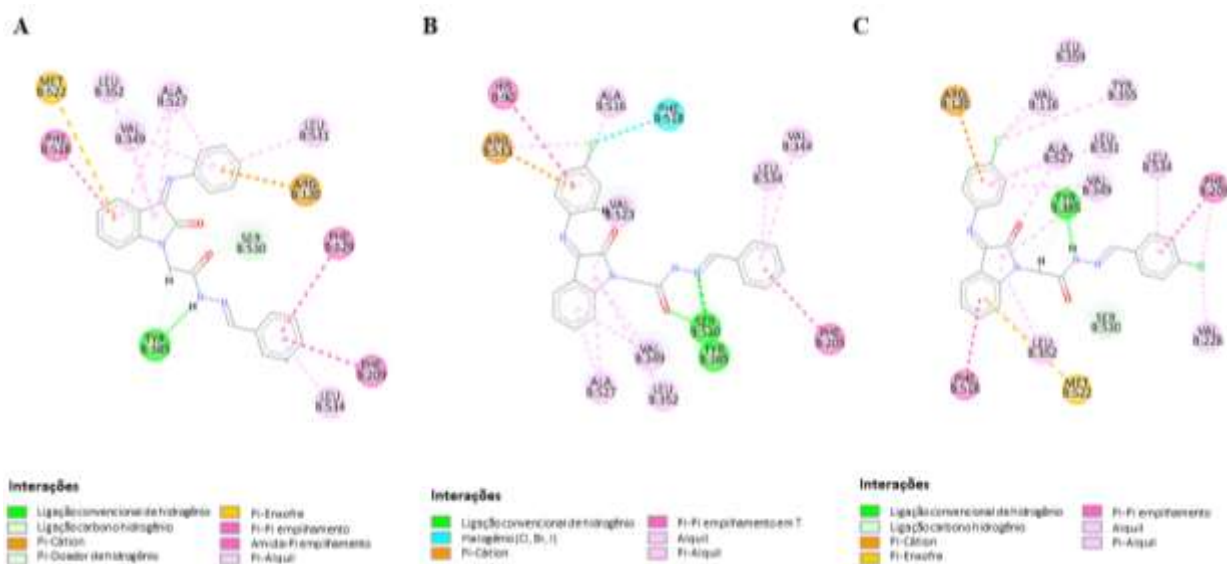
O YV-03 exibiu maior *score* entre os derivados isatínicos hidrazônicos, se aproximando do Rofecoxibe e como observado nas Figuras 28 e 29 a seguir, além de demonstrar interações com resíduos importantes para atividade inibitória como Arg⁵¹³, His⁹⁰ e Ser⁵³⁰ de forma similar ao ligante, também interagiu adicionalmente com Arg¹²⁰ e Tyr³⁸⁵ que são resíduos relevantes para o alvo e interagiu com os bolsos laterais através de interações de hidrofóbicas e de transferência de carga. Com relação aos outros compostos, todos eles estabeleceram um padrão interativo com os resíduos Ser⁵³⁰ e Tyr³⁸⁵ assim como para o composto YV-03. O YV-01 e 04 interagiram com os resíduos da entrada demonstrando que a substituição com átomos de cloro não causou impedimento estérico, inclusive para o YV-02 resultou em uma interação de halogênio com Phe⁵¹⁸, por fim destaca-se que o YV-02 ao invés de interagir com resíduos localizados na entrada, realizou interações de transferência de carga com o bolso lateral (Arg⁵¹³ e His⁹⁰).

Figura 28 – Representação das interações das poses 21 (A) e 9 (B) do YV-03 na COX-2



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

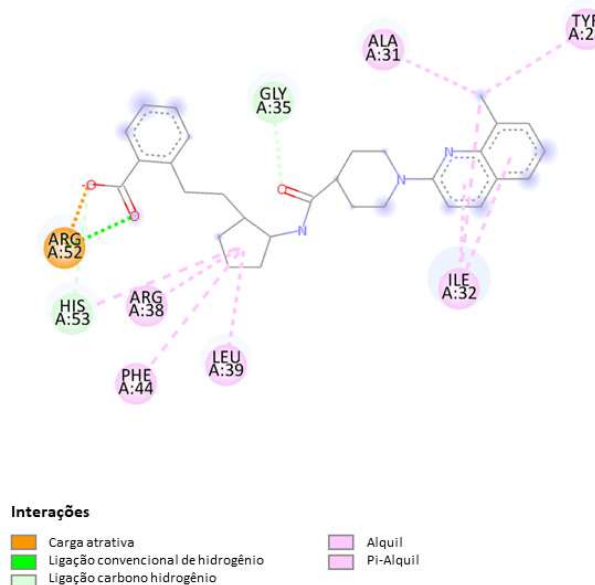
Figura 29 – Representação das interações do YV-01 (A), YV-02 (B) e YV-04 (C) na COX-2



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Entre as interações realizadas pelo ligante cocrystalizado ao alvo mPGES-1 (Figura 30), ressalta-se ligações de hidrogênio e de transferência de carga com Arg⁵² e His⁵³, bem como interagiu com o resíduo Phe⁴⁴ que acompanhado do Asp⁶⁶ é responsável pela transição entre a conformação aberta/fechada da estrutura.

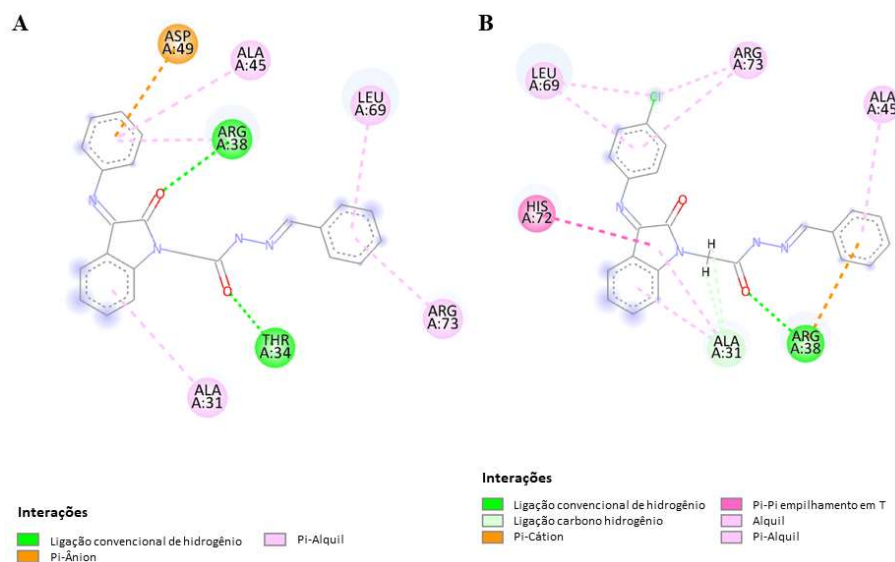
Figura 30 – Representação das interações do ligante cocrystalizado a mPGES-1



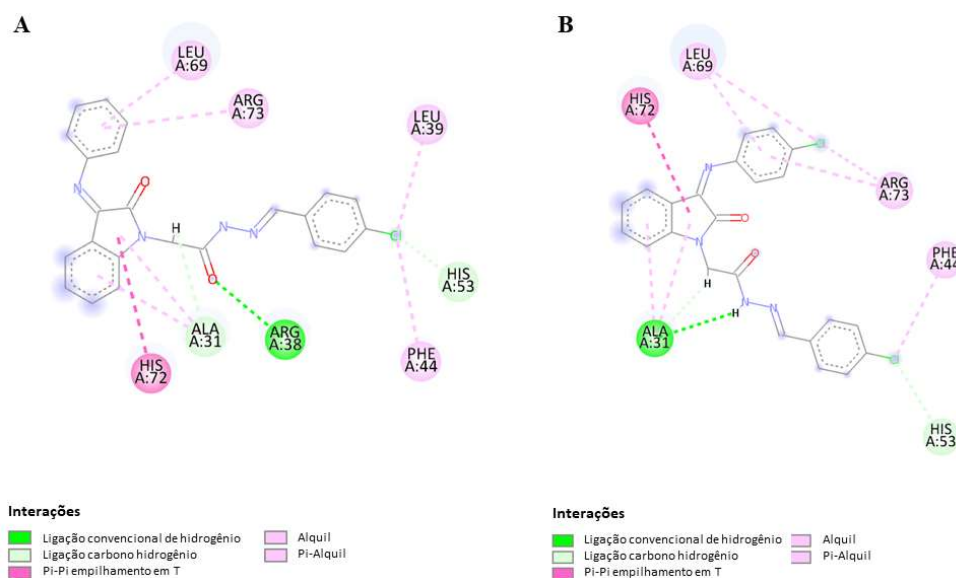
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Todos os compostos da série YV (Figuras 31 e 32) apresentaram um *score* pouco superior ao ligante e estabeleceram um padrão de interação hidrofóbica com os resíduos Leu⁶⁹ e Arg⁷³, na presença do cloro como substituinte na posição *para* essas interações dobraram. Os derivados YV-03 e YV-04 apresentaram interações com os resíduos His⁵³ e Phe⁴⁴ assim como observado para o ligante, porém apenas o YV-01 interagiu com o resíduo Asp⁴⁹ que integra o mecanismo catalítico do alvo.

Figura 31 – Representação das interações do YV-01 (A) e YV-02 (B) na mPGES-1

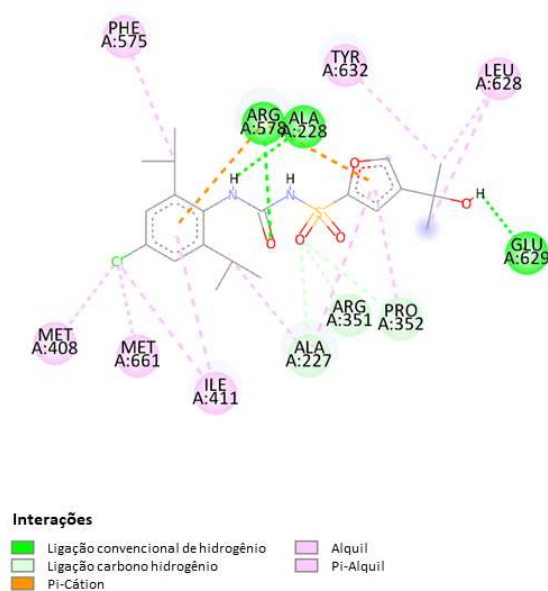


Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

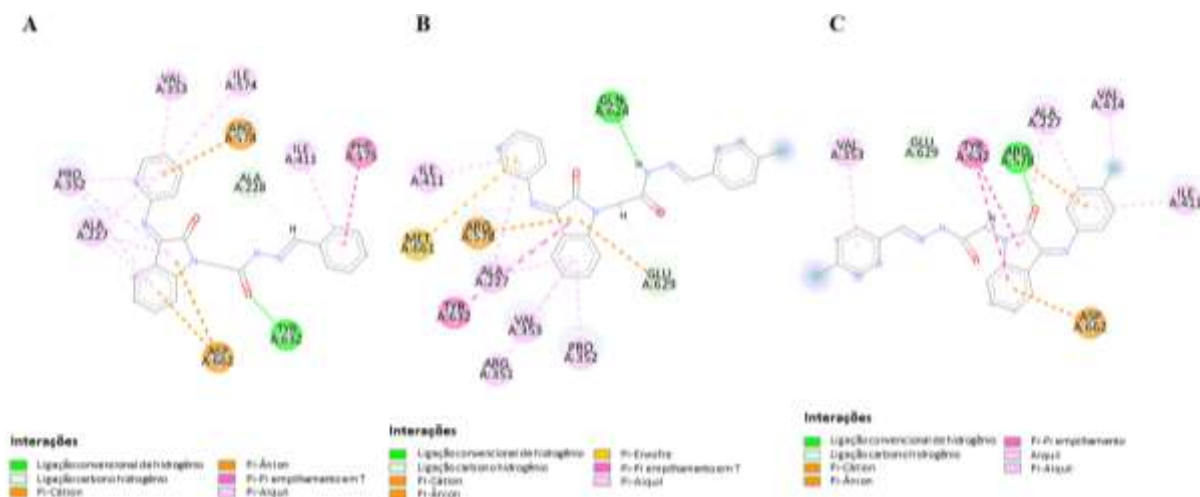
Figura 32 – Representação das interações do YV-03 (A) e YV-04 (B) na mPGES-1

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

O ligante cocrystalizado ao alvo NLRP3 realizou ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de transferência de carga com resíduos chave (Arg³⁵¹, Arg⁵⁷⁸, Glu⁶²⁹, Ala²²⁷ e Phe⁵⁷⁵) como observado na Figura 33, atingindo um *score* de 70.7469. Acerca dos compostos em estudo, inicialmente na Figura 34 tem-se as representações do YV-01, YV-03 e YV-04 ancorados ao domínio NACHT do alvo NLRP3.

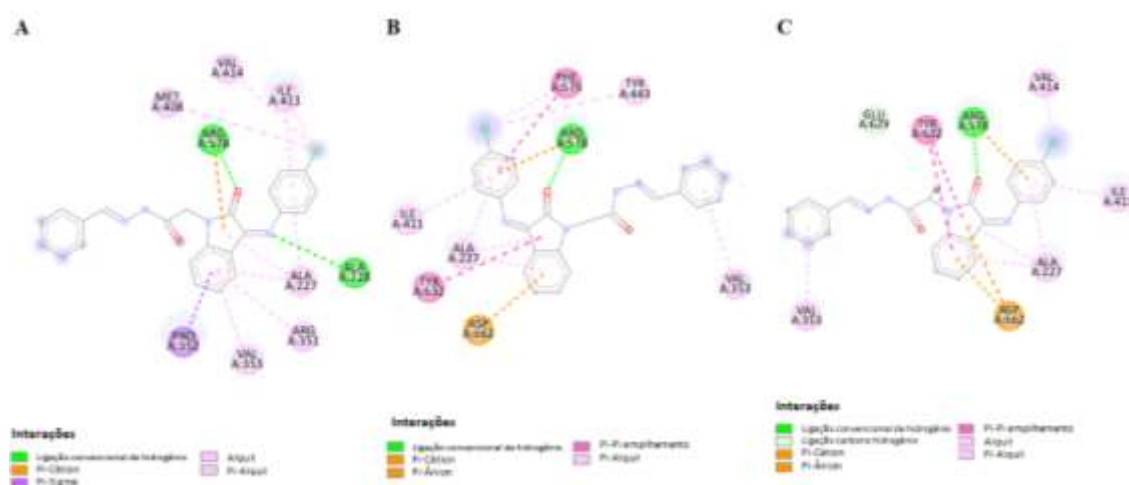
Figura 33 – Representação das interações do ligante cocrystalizado ao NLRP3

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 34 – Representação das interações do YV-01 (A), YV-03 (B) e YV-04 (C) no NLRP3

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

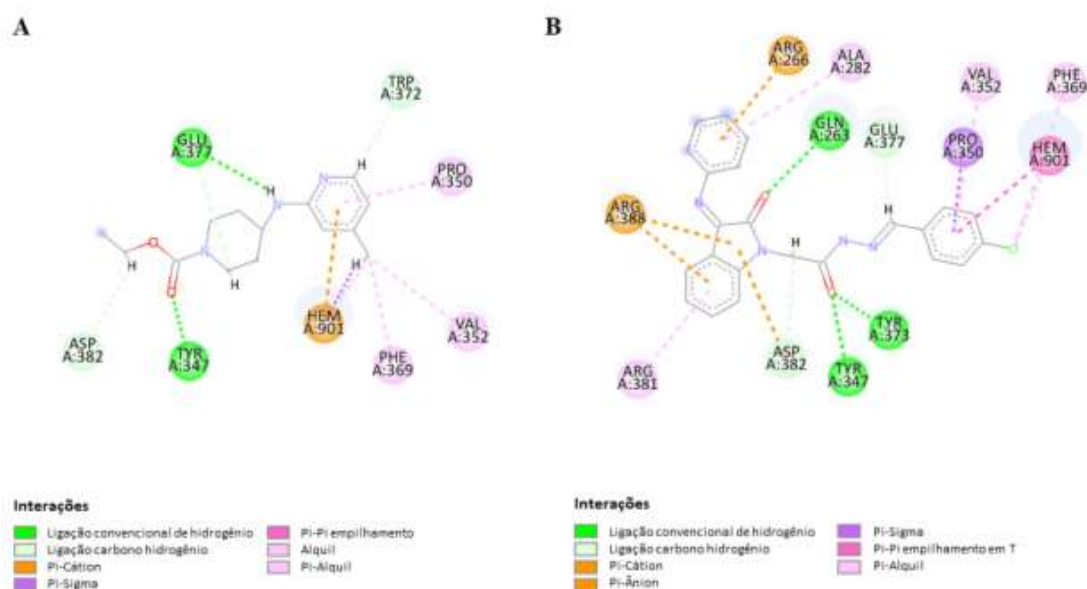
Entre os compostos analisados, os análogos YV-03 e YV-04 apresentaram valores de *score* minimamente acima do ligante, porém interagiram com 4 e 3 dos resíduos essenciais para o mecanismo catalítico, respectivamente. Enquanto o YV-02 que apresentou em média um *score* de 68 foi o único que interagiu com todos os resíduos em conformações diferentes (Figura 35) e por fim o YV-01 estabeleceu interações apenas com 3 deles. Adicionalmente, ressalta-se que todos os compostos interagiram de forma similar ao ligante em relação ao resíduo Ile⁴¹¹ por interação hidrofóbica, outro resíduo em comum foi Tyr⁶³², cujo padrão dos tipos de interação divergiu, visto que o ligante realizou interação hidrofóbica, enquanto os compostos analisados realizaram ligação de hidrogênio (YV-01) e interações de transferência de carga (YV-02, YV-03 e YV-04) fornecendo maior estabilidade para a ancoragem no alvo.

Figura 35 – Interações das poses 45 (A), 19 (B) e 72 (C) do YV-02 no NLRP3

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

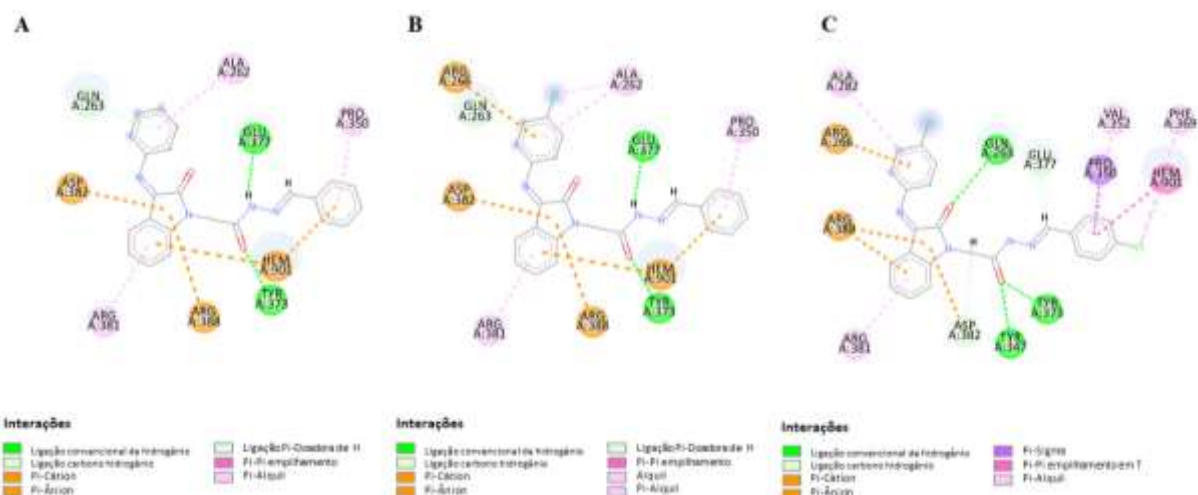
Dando continuidade a avaliação do perfil anti-inflamatório dos derivados isatínicos hidrazônicos, tem-se nas Figuras 36 e 37 as representações do ligante cocrystalizado e os compostos em estudo dentro do sítio de ligação de iNOS.

Figura 36 – Representação das interações do ligante AR-C95791 (A) e YV-03 (B) no iNOS



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 37 – Representação das interações do YV-01 (A), YV-02 (B) e YV-04 (C) no iNOS



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Considerando os resíduos relevantes para a inibição do alvo, o ligante cocrystalizado interagiu com Glu³⁷⁷, Tyr³⁴⁷ e o grupo heme (Hem⁹⁰¹), enquanto o YV-03 com menor *score*, conseguiu atingir o maior número de resíduos em comparação com os derivados isatínicos hidrazônicos e o próprio ligante, exibindo ligações de hidrogênio com Glu³⁷⁷, Gln²⁶³ e Tyr³⁴⁷,

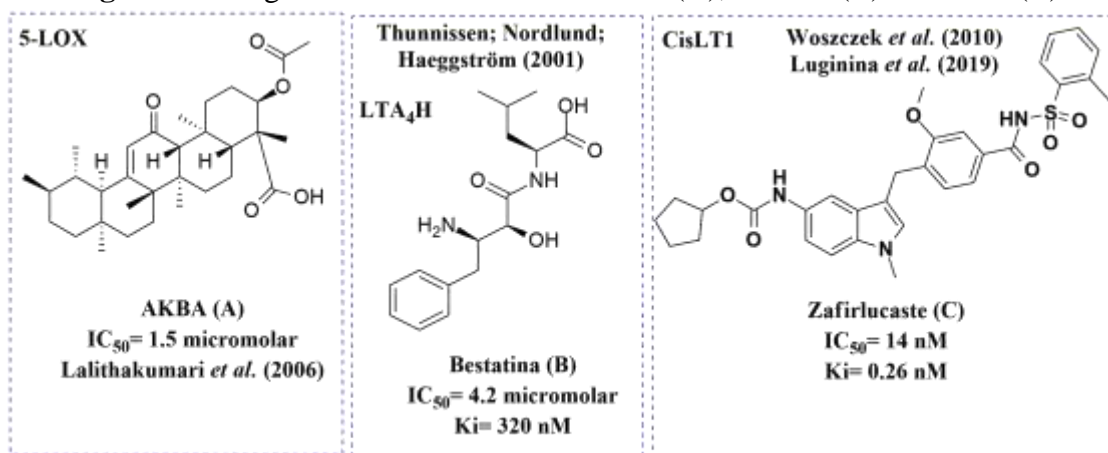
além de interagir com o grupo heme (Hem⁹⁰¹), também demonstrou interações de transferência de carga com Arg²⁶⁶ e Arg³⁸⁸. Ao ser comparado com o ligante cocrystalizado, o YV-03 possui interações em comum com os seguintes resíduos: Asp³⁸², Pro³⁵⁰, Val³⁵² e Phe³⁶⁹.

Os compostos YV-01 e YV-02 que se aproximaram mais do *score* do ligante cocrystalizado, exibiram ligações de hidrogênio com os resíduos Glu³⁷⁷ e Gln²⁶³, interações de transferência de carga com Arg²⁶⁶ e Asp³⁸² e interagiram com o grupo Heme (Hem⁹⁰¹), destacando-se uma interação adicional com Arg³⁸⁸ observada para o YV-02. Por fim, o YV-04 apresentou as mesmas interações ressaltadas para o YV-03 em razão da semelhança de *scaffold* e o segundo átomo de cloro não influenciou neste caso.

Após a análise do perfil anti-inflamatório dos compostos híbridos isatínicos hidrazônicos foi observado que para os alvos farmacológicos COX-2 e iNOS o YV-03 foi mais promissor, enquanto para os alvos mPGES-1 e NLRP3 os derivados YV-01 e YV-02, respectivamente, foram destacados em detrimento do YV-04.

Foram selecionados alvos farmacológicos com perfil antiasmático, que compõem a cascata para a formação de leucotrienos (5-LOX e LTA₄H), resultando no LTB₄, que também pode estar associado a doenças inflamatórias. Enquanto, o CisLT1 é acoplado à proteína G e ativado por leucotrienos endógenos, também conhecidos como leucotrienos cisteínicos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) que por sua vez possuem papel fundamental na asma. Na Figura 38, tem-se os ligantes cocrystalizados aos alvos selecionados.

Figura 38 – Ligantes cocrystalizados a 5-LOX (A), LTA₄H (B) e CisLT1 (C)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

E na Tabela 3 os valores de *score* relativos à ancoragem molecular com numeração das poses específicas assumidas pelos compostos entre parênteses. A Tabela 3 também destaca que todos os ligantes cocrystalizados apresentaram RMSD ≤ 2.0 Å no *redocking*, validando o

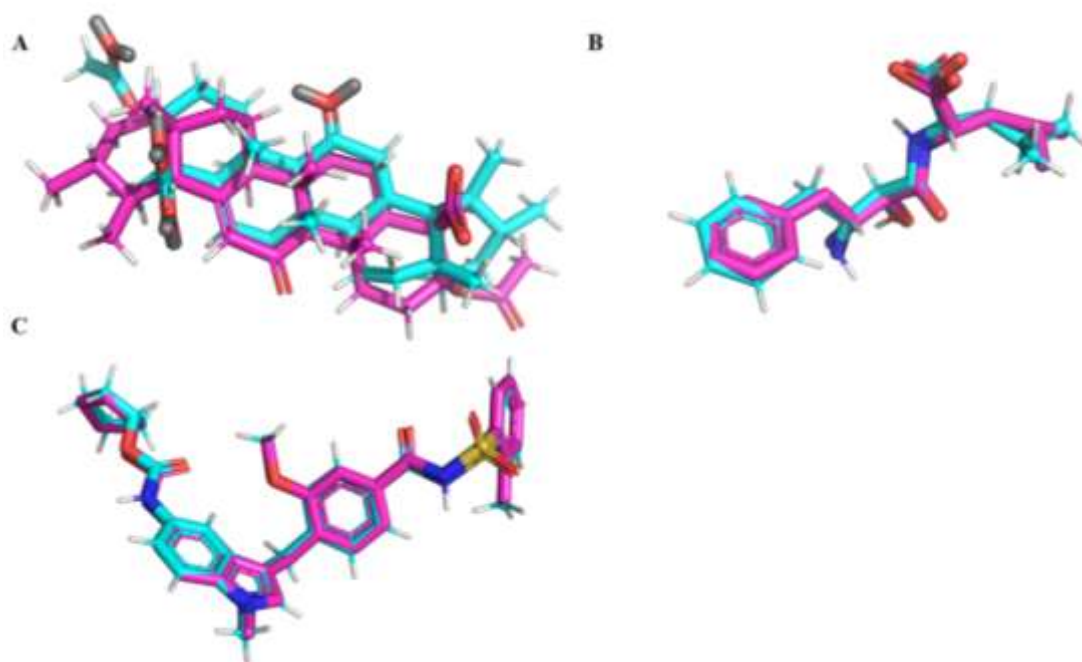
método, sendo demonstrado na Figura 39, com o ligante cocrystalizado em rosa e a pose resultante do *redocking* em azul.

Tabela 3 – Valores de *score* relativos à ancoragem molecular com perfil antiasmático

	5-LOX (6NCF)	LTA4H (1HS6)	CisLT1 (6RZ5)
YV-01	32.2280 (15)	38.6530 (47)	94.9911 (3)
YV-02	32.6805 (10)	39.8110 (72)	95.8000 (40)
YV-03	31.4410 (45)	37.2380 (43)	93.3028 (55)
YV-04	32.4114 (67)	38.5895 (32)	91.3286 (15)
AKBA	22.8491	–	–
Bestatina	–	46.8086	–
Zafirlucaste	–	–	140.0182
RMSD	2.0	0.4049	0.3188

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 39 – Sobreposição da pose de *redocking* e ligante cocrystalizado: 5-LOX (A), LTA4H (B) e CisLT1 (C)

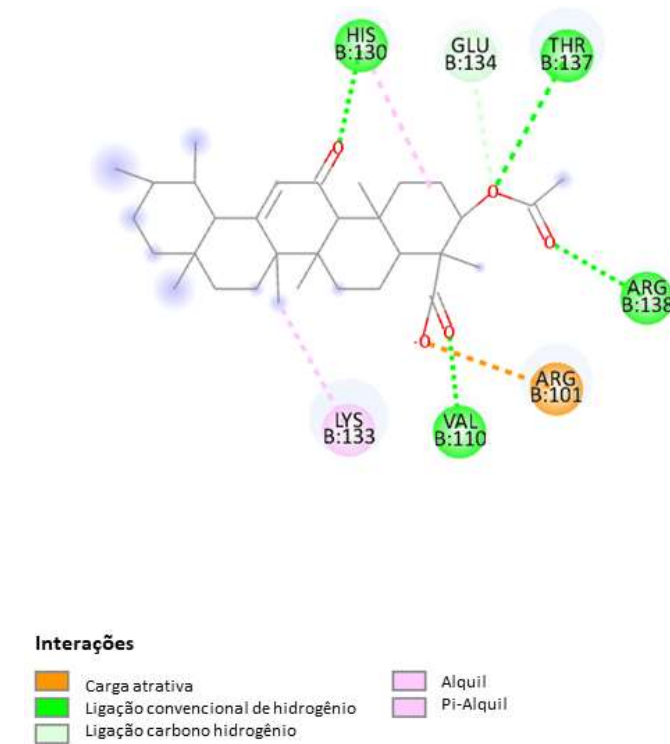


Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

O ácido araquidônico é o ligante endógeno do alvo 5-LOX e sua ligação ao sítio ativo é realizada por interações com os resíduos Ile⁴⁰⁶, His³⁷², His⁵⁵⁰, His³⁶⁷, Phe¹⁷⁷ e Gln⁴¹³, desencadeando o processo de oxigenação do AA e formação do 5-HPETE que é o precursor

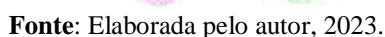
dos leucotrienos. Sendo assim, na Figura 40 tem-se as interações realizadas pelo ligante cocrystalizado AKBA (3-acetil-11-ceto-beta-ácido boswellic).

Figura 40 – Representação das interações do ligante AKBA cocrystalizado à 5-LOX



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

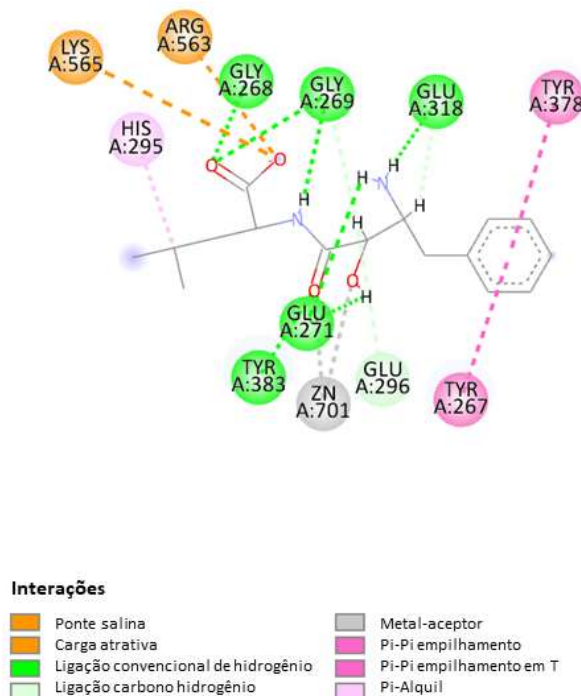
Após a análise das interações realizadas pelos compostos em estudo (Figura 41), notou-se que todos os análogos isatínicos hidrazônicos apresentaram valores de *score* superiores ao ligante, com destaque para o YV-02 que além de estabelecer interações de transferência de carga com os resíduos Arg¹⁰¹ e Asp¹⁶⁶ (região interdomínio moduladora da atividade) que também foi realizado por YV-03 e YV-04, foi o único composto que interagiu com todos os resíduos da superfície hidrofóbica do sulco (Leu⁶⁶, Val¹¹⁰, Ile¹²⁶ e Lys¹³³), sendo uma das interações de halogênio mediada pelo átomo de cloro localizado na posição *para* do anel benzeno.



No LTA4H, que dá seguimento a cascata de leucotrienos, o resultado do *redocking* na Figura 42 demonstra que esta pose do ligante bestatina possibilitou interações com o íon Zn^{2+} e os resíduos His²⁹⁵, Glu³¹⁸, Glu²⁹⁶, Tyr³⁸³ e Tyr²⁶⁷ (bolsão hidrofílico). Adicionalmente, interagiu com Lys⁵⁶⁵, Arg⁵⁶³, Gly²⁶⁸, Gly²⁶⁹, Tyr³⁷⁸ e Glu²⁷¹, estabelecendo majoritariamente ligações de hidrogênio e interações polares através de seus grupamentos polares alifáticos, a

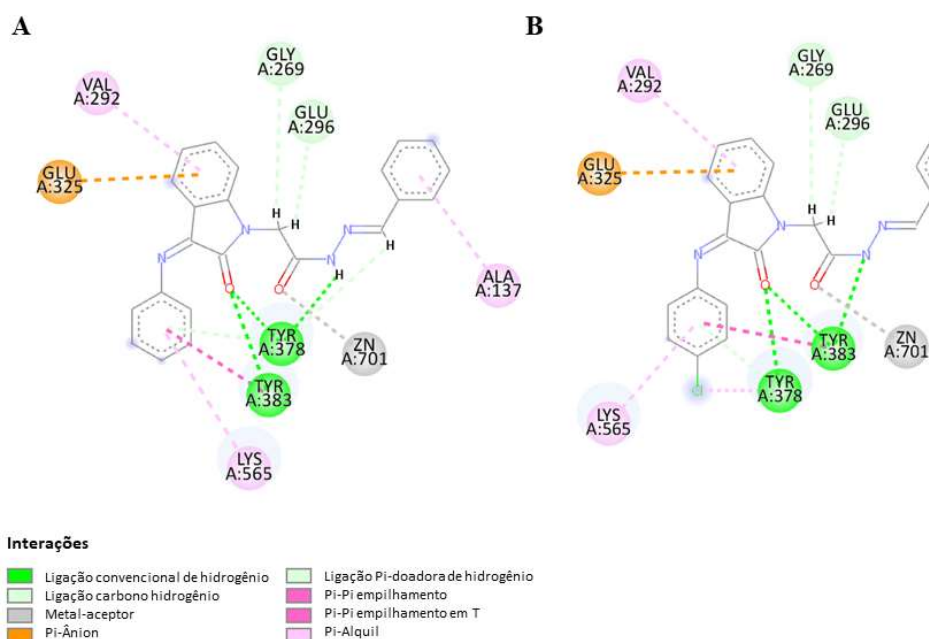
fenila foi responsável por interações de transferência de carga e o final da cadeia alifática por uma interação hidrofóbica.

Figura 42 – Representação das interações do ligante Bestatina cocrystalizado à $LT A_4H$

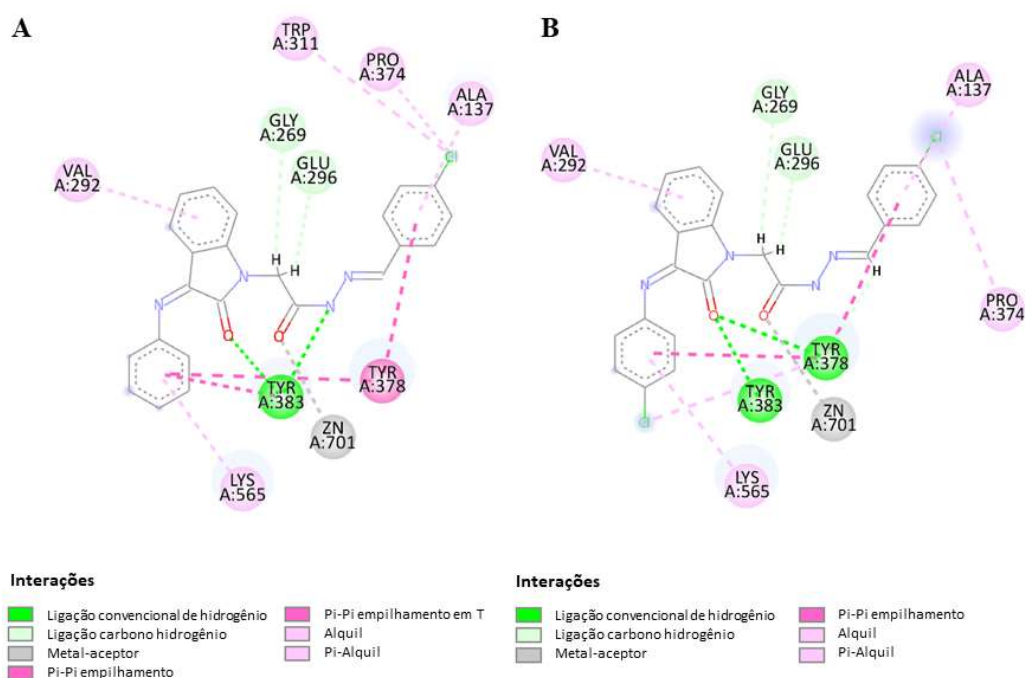


Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

No estudo realizado, o resultado do redocking acima demonstra que esta pose do ligante possibilitou interações com o íon Zn^{2+} e os resíduos His²⁹⁵, Glu³¹⁸, Glu²⁹⁶, Tyr³⁸³ e Tyr²⁶⁷ (bolsão hidrofílico) citados anteriormente, adicionalmente interagiu com Lys⁵⁶⁵, Arg⁵⁶³, Gly²⁶⁸, Gly²⁶⁹, Tyr³⁷⁸ e Glu²⁷¹, estabelecendo majoritariamente ligações de hidrogênio e interações polares através de seus grupamentos polares alifáticos, a fenila foi responsável por interações de transferência de carga e o final da cadeia alifática por uma interação hidrofóbica. A seguir tem-se as interações desenvolvidas pelos compostos em estudo descritas nas Figuras 43 e 44.

Figura 43– Representação das interações do YV-01 (A) e YV-02 (B) na LTA₄H

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 44 – Representação das interações do YV-03 (A) e YV-04 (B) na LTA₄H

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Todos os derivados da série YV realizaram interações com o íon Zn^{2+} e os resíduos Glu²⁹⁶ e Tyr³⁸³ associados à atividade de clivagem peptídica da enzima, bem como Tyr²⁶⁷ que compõe o bolsão hidrofílico, de forma adicional os compostos compartilharam interações com os resíduos Gly²⁶⁹, Val²⁹², Lys⁵⁶⁵ e Ala¹³⁷. Como pode-se observar nas Figuras 43 e 44, os

derivados YV-01 e 02 assumiram um padrão de interação similar entre si e divergentes em relação aos compostos YV-03 e 04 que também se assemelham entre si quanto as interações adicionais. Nesse sentido, ressalta-se que YV-01 e 02 interagiram adicionalmente com Glu325 e diferem pelas ligações de hidrogênio adicionais estabelecidas pelo composto YV-02 que atingiu o maior *score* da série YV. Enquanto, o YV-03 realizou interações hidrofóbicas com Trp³¹¹ e Pro³⁷⁴ através do átomo de cloro na posição *para*, este também ocasionou a interação do YV-04 com Pro³⁷⁴, tais interações não são observadas para os compostos YV-01 e 02 que não possuem a porção *N*-benzilidenoacilhidrazona clorada.

Por fim, no receptor cisLT1 que é ativado por leucotrienos endógenos também conhecidos como leucotrienos cisteínicos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄). O inibidor cocrystalizado zafirlucaste realizou interações com 4 dos resíduos relevantes que interagem com o ligante endógeno LTD₄ e que portanto influenciam na inibição do alvo, sendo eles Tyr¹⁰⁴, Tyr²⁴⁹, Arg²⁵³ por ligações de hidrogênio e Val²⁷⁷ por interações hidrofóbicas como observado na Figura 45, de forma adicional tem-se interações com os seguintes resíduos: His²⁵⁶, Pro¹⁷⁶, Ser¹⁹³, Tyr¹⁰⁸, Val¹⁵¹, Phe¹⁵⁸, Thr¹⁵⁴, Pro¹⁵⁷ e Leu¹⁸⁹ através de ligação de hidrogênio, transferência de carga e interações hidrofóbicas.

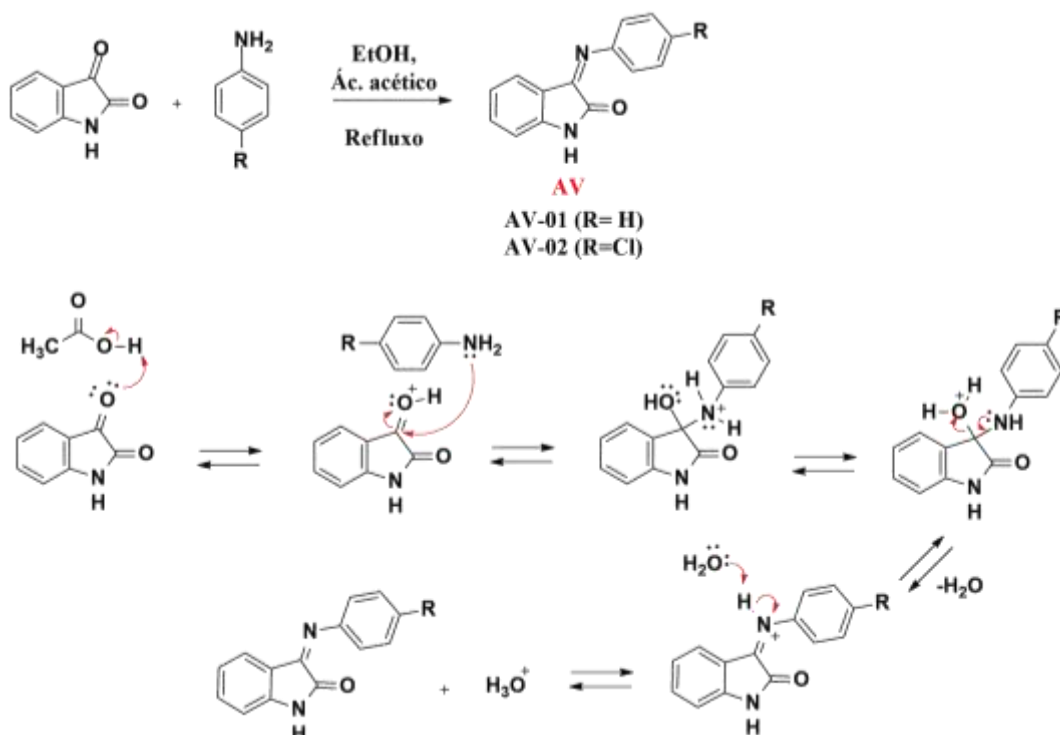
Na Figura 46, tem-se as interações estabelecidas pelos compostos isatínicos hidrazônicos e ressalta-se que todos os compostos interagiram com Tyr¹⁰⁴, Tyr²⁴⁹ e Arg²⁵³ por ligações de hidrogênio, mas os compostos com a porção 4-clorofenilimino (YV-02 e YV-04) realizaram interação hidrofóbica adicional com Val²⁷⁷. Com relação às interações adicionais, todos os derivados da série YV interagiram com os resíduos His²⁵⁶, Ser¹⁹³ e Tyr¹⁰⁸ por transferência de carga e ligações de hidrogênio, mas apenas os compostos com a porção *N*-benzilidenoacilhidrazona clorada (YV-03 e YV-04) estabeleceram interações hidrofóbicas com Val196, Phe112 e Val196. Ademais, o YV-02 assumiu uma conformação divergente dos demais compostos que garantiu um número maior de ligações de hidrogênio e consequente maior *score*.

interativa dentro do sítio ativo dos respectivos alvos, logo é o mais promissor para a atividade antiasmática pela interferência na cascata dos leucotrienos (5-LOX e LTA4H) e CisLT1.

5.2 Síntese e caracterização físico-química

A primeira etapa da rota sintética executada envolve a condensação do núcleo isatínico à anilina e conforme descrito por Marhoon e colaboradores (2014) ocorre em etanol, com 2-3 gotas de ácido acético sob refluxo. Após a dissociação do ácido acético, tem-se a ativação da carbonila e ressonância com a transferência de elétrons do carbono para o oxigênio. Em seguida, como observado na Figura 47, tem-se a adição da anilina ao centro eletrofílico do carbono ligado ao grupo OH, formando um intermediário tetraédrico. Ocorre tropismo do hidrogênio do grupo NH_2 para o OH, com formação de uma molécula de água que posteriormente é eliminada, seguido da formação de uma ligação dupla, por fim a molécula de água captura o hidrogênio do grupo NH, formando o íon hidrônio e o intermediário AV.

Figura 47 – Mecanismo de reação para a obtenção dos intermediários AV



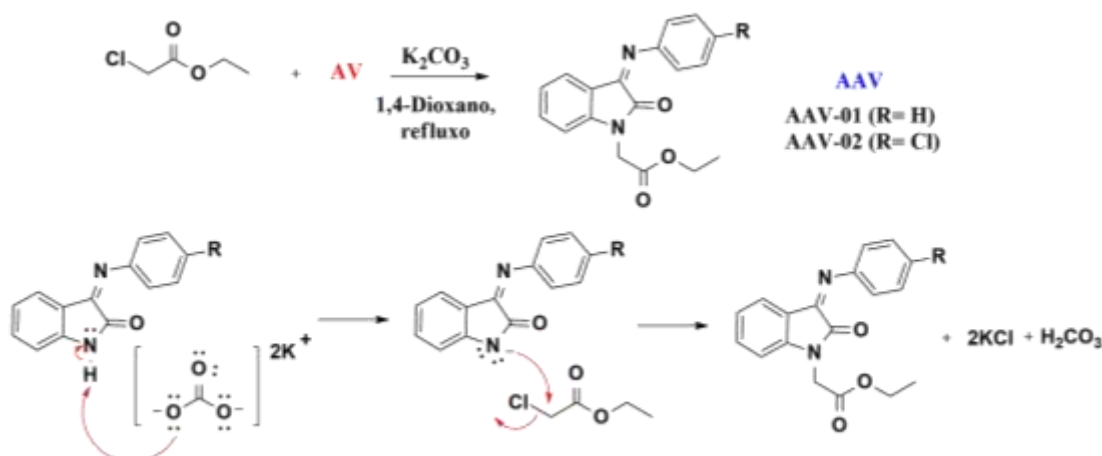
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Após a finalização da reação, tem-se a filtração e recristalização em etanol, Marhoon e colaboradores (2014) obtiveram o composto sem substituinte (3-(fenilimino)indolin-2-one) com um rendimento de 87% e para os derivados substituídos foi observado uma variação de

56-96% de rendimento. Nesse sentido, ao reproduzir essa etapa, os intermediários AV-01 e AV-02 foram obtidos na forma de um pó laranja e com rendimento de 81,25 e 86,00% que foi uma margem condizente com os resultados exibidos na literatura.

De acordo com a literatura, a etapa de *N*-alquilação que resulta nos intermediários AAVs pode ser realizada através de uma reação com bromoacetato de etila e K_2CO_3 em DMF (Aarjane *et al.*, 2020), porém foi feita a substituição por cloroacetato de etila devido à disposição do reagente, com adicional substituição do DMF por outro solvente polar aprótico, como 1,4-dioxano na tentativa de reduzir o tempo de rotaevaporação do solvente. Conforme destacado na Figura 48, após a dissociação do K_2CO_3 ele atua como uma base abstraindo o próton do grupo NH do intermediário AV, facilitando a ocorrência da reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN_2) entre o intermediário AV e o reagente cloroacetato de etila, resultando na saída do cloro e formação do intermediário AAV.

Figura 48 – Mecanismo de reação para a obtenção dos intermediários AAV



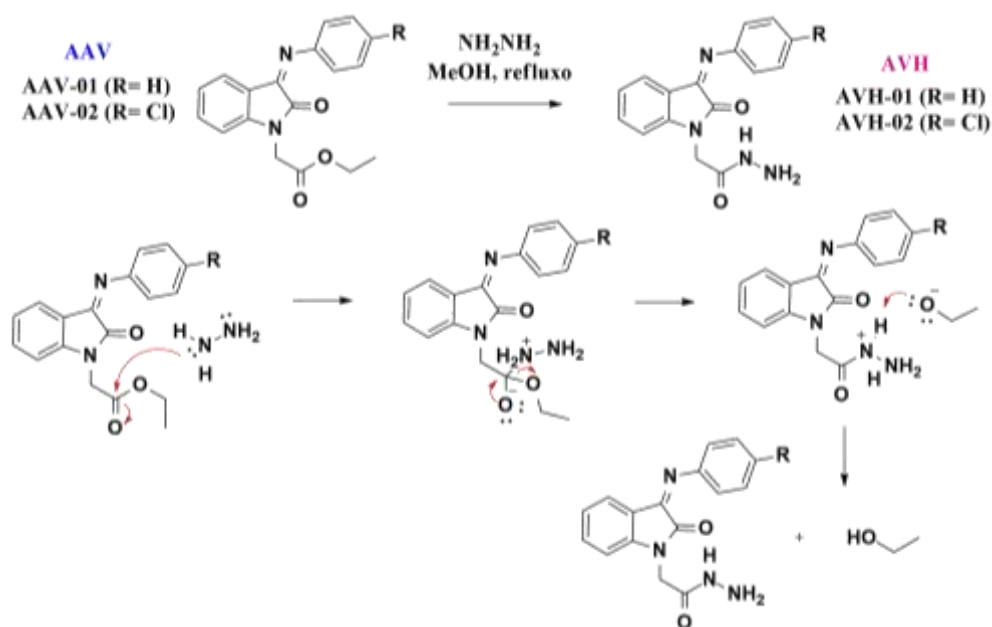
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Após a finalização desta etapa e realização da rotaevaporação, para o AAV-01 foi necessário realizar uma separação líquido:líquido (diclometano:água) em razão da obtenção de um produto oleoso, já o AAV-02 cristalizou normalmente sem necessitar da etapa adicional, obtendo os intermediários AAV-01 e AAV-02 com um rendimento de 96,27 e 95,8%, respectivamente.

Adicionalmente, Aarjane e colaboradores (2020) descrevem a reação de hidrazinação aplicada à etapa de obtenção dos intermediários AVH, envolvendo uma reação de adição-eliminação nucleofílica nos átomos de carbono acílico como observada na Figura 49. A hidrazina atua como catalisador e como reagente nessa reação visto que após a ressonância

entre o carbono e oxigênio da carbonila do éster, o par de elétrons livres do nitrogênio da hidrazina ataca a porção eletrofílica, formando uma estrutura tetraédrica, com o retorno da dupla ligação entre o carbono e oxigênio, originando novamente a carbonila, tem-se a saída do alcóxido que em seguida captura o hidrogênio do grupo NH_2 carregado positivamente, formando o intermediário AVH e etanol.

Figura 49 – Mecanismo de reação para a obtenção dos intermediários AVH

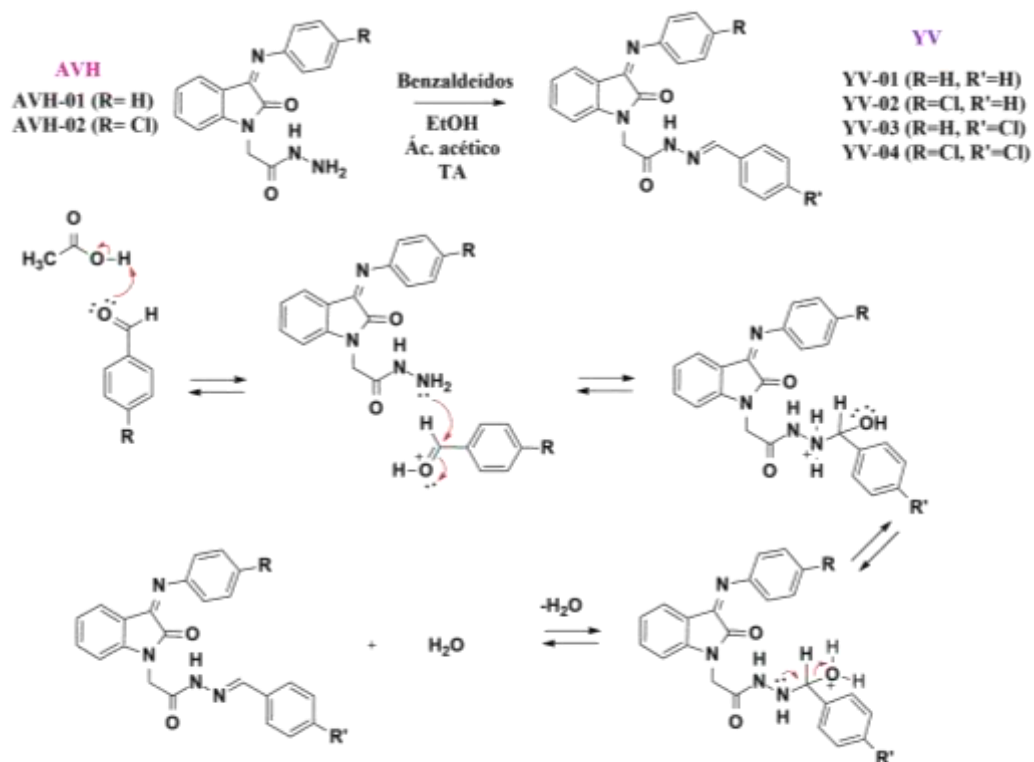


Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Ao reproduzir a hidrazinação descrita na literatura, em razão da disponibilidade de reagente foi utilizado hidrazina à 50% e por este motivo adicionou-se 10 eq., obtendo os intermediários AVH-01 e AVH-02 na forma de um pó rosa claro/salmão com rendimento de 46,51 e 36,18%, respectivamente, e tais rendimentos são esperados para esse tipo de reação, visto que como mencionado anteriormente a hidrazina atua como catalisador e reagente, além disso foi utilizada uma solução aquosa que facilita sua oxidação.

Por fim, conforme descrito por Aarjane e colaboradores (2020) a partir de uma reação de condensação entre os intermediários AVH e benzaldeídos (sem substituição ou com substituição 4-cloro) em etanol e ácido acético à temperatura ambiente foram obtidos os compostos finais (YV-01, YV-02, YV-03 e YV-04), cujo mecanismo de reação está detalhado na Figura 50.

Figura 50 – Mecanismo de reação para a obtenção dos compostos finais YV 01-04



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Esta etapa final de condensação é semelhante a primeira etapa da rota sintética descrita anteriormente, a partir da dissociação do ácido acético, tem-se a ativação da carbonila do benzaldeído, por meio da protonação do oxigênio, seguida da ressonância entre o carbono e oxigênio, tornando o carbono um centro eletrofílico que sofre o ataque do par de elétrons livres do grupo NH₂ do intermediário AVH. Com isso tem-se a formação da estrutura tetraédrica e tropismo do hidrogênio de NH₂ para o grupo OH, formando uma molécula de água que é posteriormente eliminada, ao mesmo tempo que tem-se a formação do grupo imina, com a obtenção dos compostos finais.

A caracterização das propriedades físico-químicas e solubilidade aparente dos compostos finais (YV01-04) estão dispostas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 – Características físico-químicas dos compostos finais

Composto	Aparência	PM	Rend%	FF (°C)	R _f	FM	Log P
YV-01	Pó amarelo claro	382,41	92,24	291-293	0.66 ^a ; 0.24 ^b	C ₂₃ H ₁₈ N ₄ O ₂	3,74
YV-02	Pó amarelo claro	416,86	92,90	273-276	0.66 ^a ; 0.22 ^b	C ₂₃ H ₁₇ ClN ₄ O ₂	4,29
YV-03	Pó laranja	416,86	78,95	267-269	0.63 ^a ; 0.23 ^b	C ₂₃ H ₁₇ ClN ₄ O ₂	4,29
YV-04	Pó laranja	451,30	69,67	257-260	0.63 ^a ; 0.26 ^b	C ₂₃ H ₁₆ Cl ₂ N ₄ O ₂	4,85

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Legenda: PM – Peso molecular (g/mol); Rend% – Rendimento (%); F.F. – Faixa de fusão; R_f – Fator de retenção sendo a: Sistema Hexano/Acetato de etila 6:4 e b: Sistema Diclorometano: Metanol 95:5; FM – Fórmula molecular; Log P teórico – coeficiente de partição octanol: água.

Tabela 5 – Solubilidades aparentes dos compostos finais

Compostos	YV-01	YV-02	YV-03	YV-04
Solúveis	AcOEt, CH ₃ (CO)CH ₃ , ACN, CHCl ₃ , DCM, DMF, DMSO, EtOH, MeOH, PropOH e C ₆ H ₅ CH ₃	AcOEt, CH ₃ (CO)CH ₃ , ACN, CHCl ₃ , DCM, DMF, DMSO, EtOH, MeOH, PropOH e C ₆ H ₅ CH ₃	DMF e DMSO	DMF e DMSO
Insolúveis	–	–	AcOEt, CH ₃ (CO)CH ₃ , ACN, CHCl ₃ , DCM, EtOH, MeOH, PropOH e C ₆ H ₅ CH ₃	AcOEt, CH ₃ (CO)CH ₃ , ACN, CHCl ₃ , DCM, EtOH, MeOH, PropOH e C ₆ H ₅ CH ₃

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Legenda: Acetato de etila (AcOEt); Acetona [CH₃(CO)CH₃]; Acetonitrila (ACN); Clorofórmio (CHCl₃); Diclorometano (DCM); Dimetilformamida (DMF); Dimetilsulfóxido (DMSO); Etanol (EtOH); Metanol (MeOH); Propanol (PropOH); Tolueno (C₆H₅CH₃)

Conforme observado na Tabela 4, os compostos finais possuem peso molecular variando entre 382,41 e 451,30 g/mol, bem como apresentaram log P teórico entre 3,74 e 4,85, estando dentro dos parâmetros estabelecidos pela regra dos 5 de Lipinski que determina peso

molecular menor ou igual a 500 g/mol e log P menor ou igual a 5, uma análise mais detalhada do perfil farmacocinético *in silico* e *druglikeness* será abordado posteriormente.

Ademais, destaca-se que o rendimento esteve entre 69,67 e 92,90% demonstrando a viabilidade da rota sintética e obtenção de compostos com variação entre 2-3°C na faixa de fusão (F.F.), indicando um grau de pureza.

Conforme observado na Tabela 5, as moléculas YV-01 e YV-02 que se apresentam como pó amarelo claro demonstraram um padrão de solubilidade semelhante entre si e divergente quando comparado com YV-03 e YV-04 que são pós de coloração laranja. Ao analisar as estruturas das moléculas, observa-se que a semelhança estrutural seria relativa à porção *N*-benzilidenoacilhidrazona.

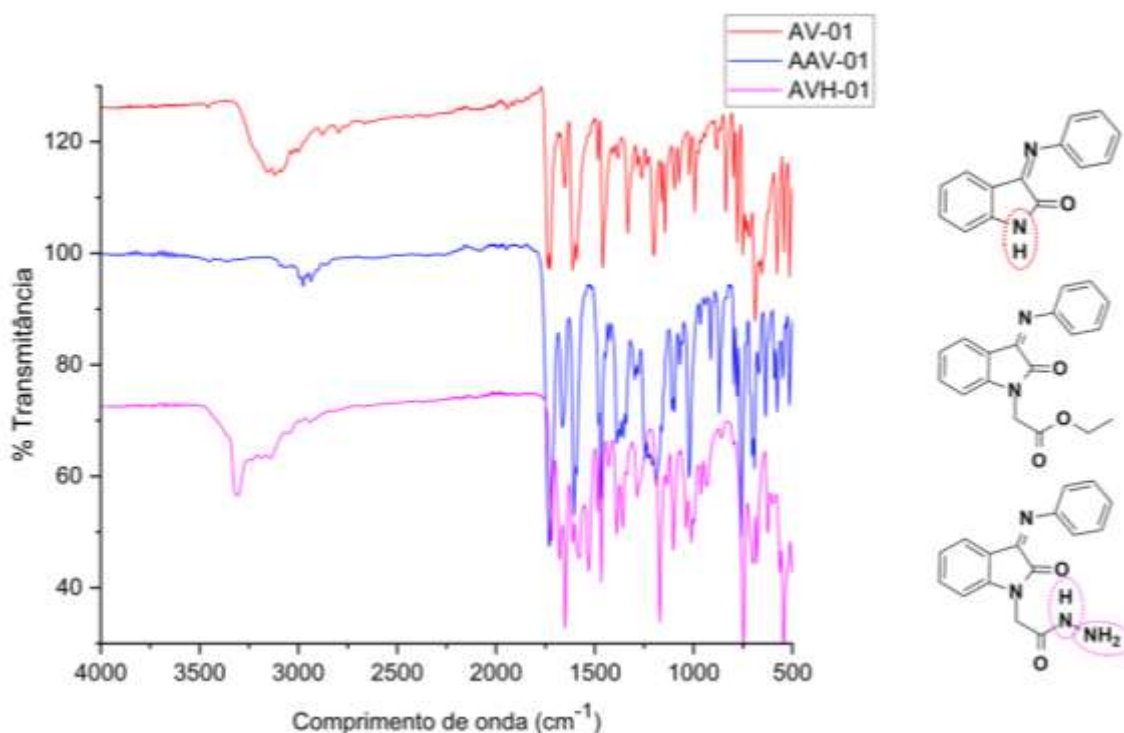
5.3 Caracterização estrutural dos compostos sintetizados

5.3.1 Análise por espectroscopia no infravermelho

A obtenção dos espectros de IV dos intermediários (AV, AAV e AVH) permitiu o acompanhamento das reações propostas, como por exemplo a *N*-alquilação que teve AV-01 como reagente de partida, resultando no AAV-01. A Figura 51 demonstra que o espectro do AV-01 possui uma banda de estiramento N-H de amida cíclica em 3160 cm⁻¹, enquanto como previsto o AAV-01 não apresenta esta banda. E após a reação de hidrazinação, nota-se o aparecimento de duas bandas características de N-H de amina primária em 3310 e 3238 cm⁻¹, bem como uma banda de estiramento de N-H relativa à amida secundária em 3172 cm⁻¹.

De acordo com Pavia e colaboradores (2016), aminas primárias geram duas bandas próximas de 3500-3300 cm⁻¹ relativas ao estiramento da ligação N-H. Enquanto amidas secundárias geram uma banda por volta de 3300 cm⁻¹. Porém, conforme relatado na literatura, o estiramento N-H de amidas cíclicas como do núcleo isatínico se apresenta próximo a 3200 cm⁻¹ (Chinnasamy; Sundararajan; Govindaraj, 2010; Khalid; Sumrra; Chohan, 2020) como observado no espectro do composto AV-01. Adicionalmente, Munir e colaboradores (2021) caracterizaram compostos *N*-acilhidrazônicos e dentre os intermediários foram destacadas absorções em 3345 cm⁻¹ e 3256 cm⁻¹ para estiramento N-H de amina primária e entre 3195-3310 cm⁻¹ para estiramento N-H de amida secundária, conforme observado no espectro do composto AVH-01.

Figura 51 – Representação comparativa dos espectros de IV dos compostos intermediários



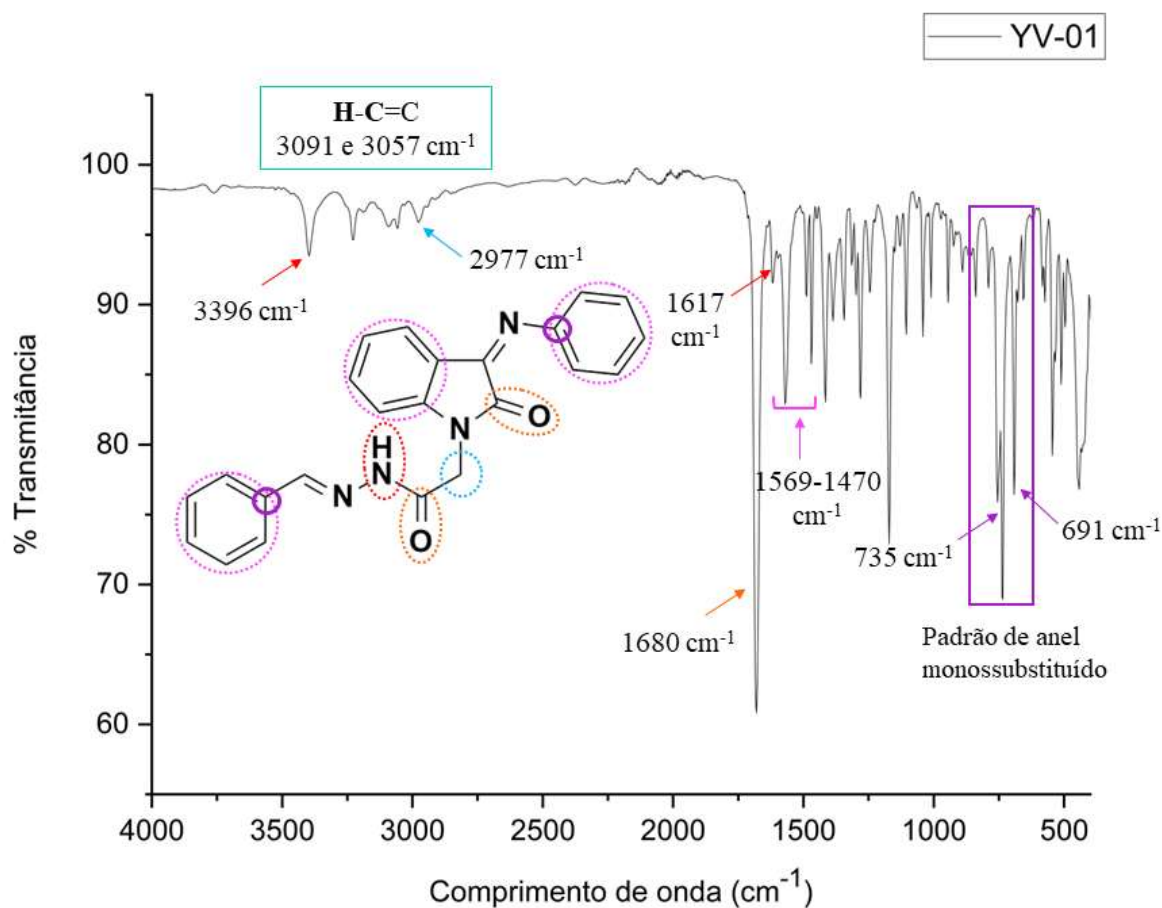
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

No espectro do composto final sem substituintes (YV-01) na Figura 52, notou-se uma banda sugestiva do grupo NH de amida secundária em 3396 cm^{-1} e uma banda forte de carbonila de amida em 1680 cm^{-1} , que por sua vez pode ter sobreposto as bandas referentes às iminas cuja frequência de absorção varia entre $1640\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$, seguida de uma absorção fraca em 1617 cm^{-1} sugestiva de dobramento da ligação N-H de amida secundária que pode estar entre 1650 e 1515 cm^{-1} de acordo com Silverstein e colaboradores (2019). Ademais, observou-se bandas características de estiramento de C-H Sp^2 em 3057 e 3091 cm^{-1} , bem como de C-H sp^3 em 2977 cm^{-1} , tendo em vista que estiramento da ligação C-H de carbono sp^3 ocorre em valores abaixo de 3000 cm^{-1} e para carbono sp^2 em valores acima de 3000 cm^{-1} ($3095\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$) (PAVIA *et al.*, 2016)

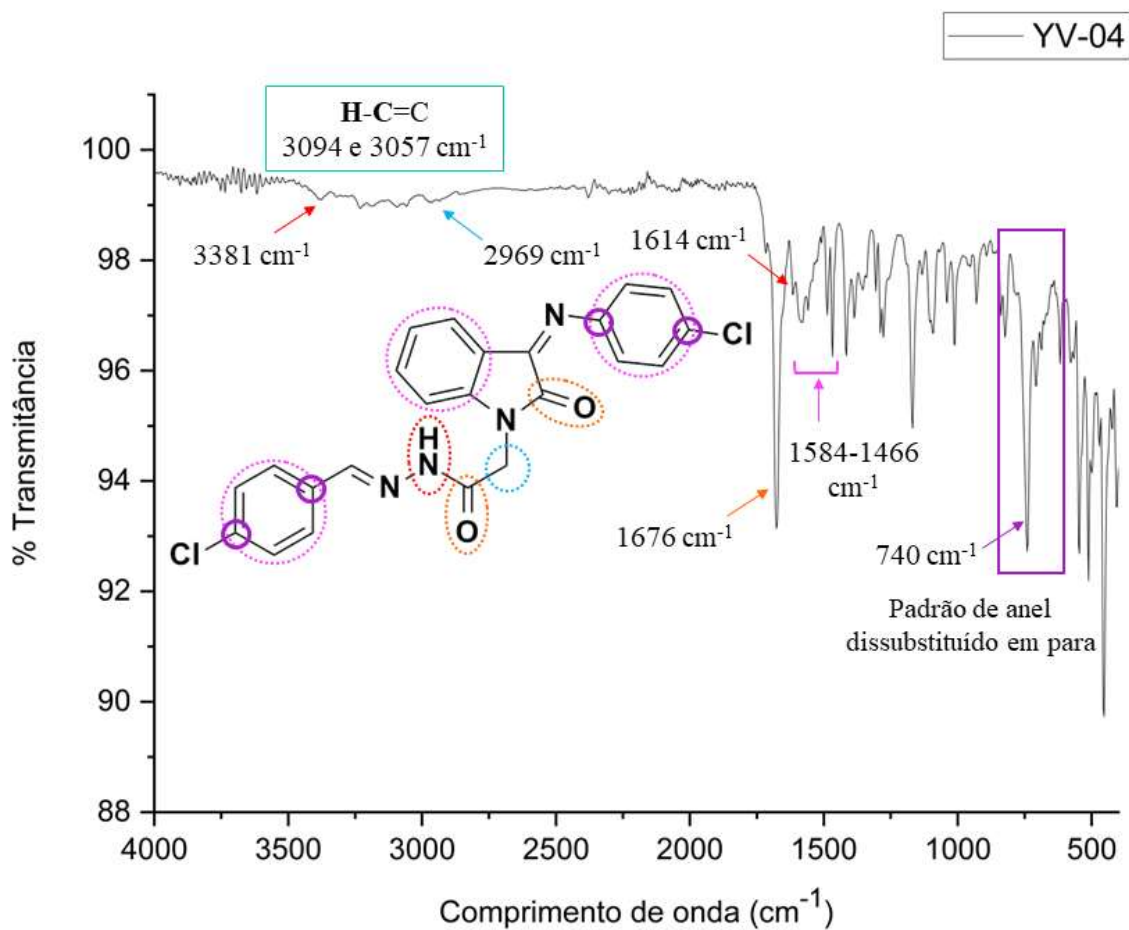
A região entre $1600\text{--}1475\text{ cm}^{-1}$ é característica de absorções de estiramento C=C de anel aromático, as bandas dentro dessa região foram observadas com valores entre $1569\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$ no espectro. Além disso, ambos anéis benzênicos do YV-01 são monossubstituídos e de acordo com Pavia e colaboradores (2016) esse padrão de substituição gera uma duas bandas com forte absorção, sendo a primeira próxima de 690 cm^{-1} e a segunda próxima de 750 cm^{-1} , no espectro do composto YV-01 foram observadas bandas de forte absorção em 691 cm^{-1} e 735 cm^{-1} , enquanto que no espectro do YV-04 (Figura 53) esse padrão não foi observado, pois esse

composto apresenta os dois anéis benzênicos para-dissubstituídos e nesse caso geralmente tem-se uma banda forte na região entre 800-850 cm^{-1} , no espectro do YV-04 essa banda apareceu em 740 cm^{-1} .

Figura 52 – Espectro de IV do composto final YV-01



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 53 – Espectro de IV do composto final YV-04

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Por fim, destaca-se na Tabela 6 as frequências de absorção dos grupos mais importantes referentes aos compostos finais.

Tabela 6 – Valores de absorção obtidos pela espectroscopia de infravermelho

Compostos	Comprimento de onda (cm ⁻¹)
YV-01	3396 (estiramento N-H de amida secundária); 3091 (estiramento C-H de carbono sp ²); 3057 (estiramento C-H de carbono sp ²); 2977 (estiramento C-H de carbono sp ³); 1680 (estiramento C=O de amida); 1617 (dobramento N-H de amida secundária); 1569 a 1470 (estiramento C=C de aromático); 735 (dobramento C-H fora do plano) 691 (dobramento C-H fora do plano).
YV-02	3396 (estiramento N-H de amida secundária); 3093 (estiramento C-H de carbono sp ²); 3057 (estiramento C-H de carbono sp ²); 2976 (estiramento C-H de carbono sp ³); 1679 (estiramento C=O de amida); 1613 (dobramento N-H de amida secundária); 1569 a 1469 (estiramento C=C de aromático); 737 (dobramento C-H fora do plano) 689 (dobramento C-H fora do plano).
YV-03	3382 (estiramento N-H de amida secundária); 3092 (estiramento C-H de carbono sp ²); 3055 (estiramento C-H de carbono sp ²); 2971 (estiramento C-H de carbono sp ³); 1674 (estiramento C=O de amida); 1614 (dobramento N-H de amida secundária); 1580 a 1466 (estiramento C=C de aromático); 738 (dobramento C-H fora do plano).
YV-04	3381 (estiramento N-H de amida secundária); 3094 (estiramento C-H de carbono sp ²); 3057 (estiramento C-H de carbono sp ²); 2969 (estiramento C-H de carbono sp ³); 1676 (estiramento C=O de amida); 1614 (dobramento N-H de amida secundária); 1584 a 1466 (estiramento C=C de aromático); 740 (dobramento C-H fora do plano).

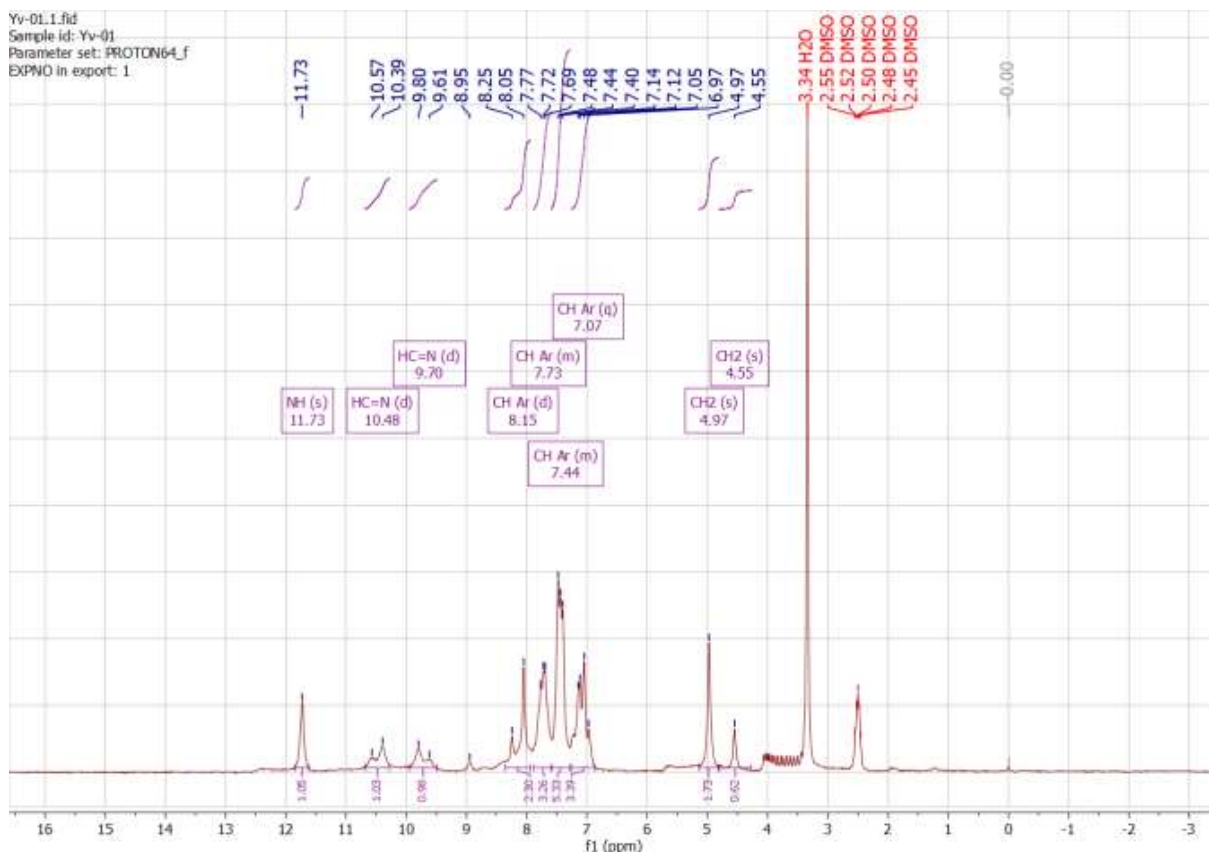
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

5.3.2 Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Dando continuidade a caracterização, foi realizada a análise prévia dos compostos finais através de RMN de ^1H (80 MHz). Na Figura 54, tem-se o espectro referente ao YV-01 e destaca-se dois simpletos sugestivos do CH_2 que se encontra entre duas amidas (uma alifática e outra cíclica) em 4,97 e 4,55 ppm, seguido da região dos hidrogênios aromáticos entre 7,0-8,0 ppm. Posteriormente, tem-se uma feição de sinal similar a dois dupletos em 9,70 e 10,48 ppm possivelmente referentes ao hidrogênio do grupo imínico e por fim em 11,73 ppm é observado um simpleto relacionado ao hidrogênio da amida secundária.

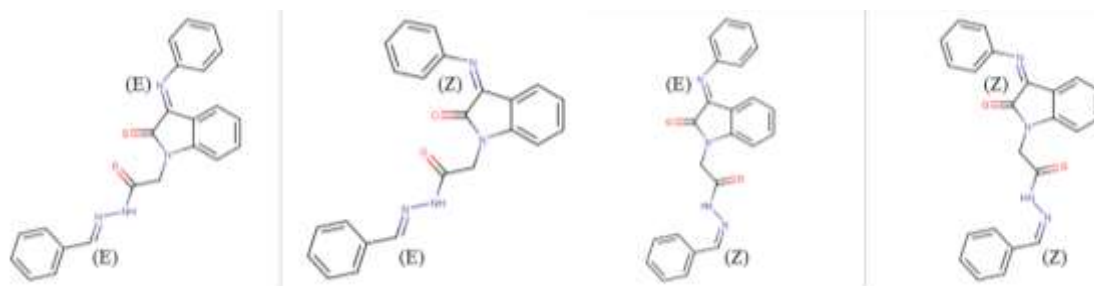
A rotação ao longo da ligação $\text{HC}=\text{N}$ do grupo imina pode gerar dois estereoisômeros geométricos, ou seja, formas E e Z, no caso do YV-01, por possuir dois grupamentos imínicos apresenta 4 estereoisômeros possíveis (Figura 55). Além disso, a rotação através da ligação amida ocasiona estereoisomerismo conformacional, logo compostos N-acilhidrazônicos podem existir como conformeros sinperiplanar (sp) e antiperiplanar (ap) (Munir *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2022).

Figura 54 – Isômeros Z-E possíveis do composto YV-01



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 55 – Estereoisômeros Z-E possíveis do composto YV-01



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

A mistura de estereoisômeros geométricos e conformeros justifica a observação de picos duplicados para CH_2 e quaduplicados para $\text{N}=\text{CH}$, possivelmente em razão da baixa resolução do espectro não foi possível observar a duplicação do sinal de deslocamento químico para o NH. Ademais, para os prótons $\text{N}=\text{CH}$, os sinais de campo baixo são atribuídos a conformação antiperiplanar (ap) enquanto os sinais de campo ascendente a conformação sinperiplanar (sp), por apresentar 4 estereoisômeros dois estão em conformação antiperiplanar e os outros em conformação sinperiplanar gerando dois sinais com feição de duplete. De forma contrária, para os prótons de metileno o sinal de campo alto é denotado como antiperiplanar enquanto sinal de campo baixo como sinperiplanar (Munir *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2022).

De acordo com Silverstein e colaboradores (2019), o hidrogênio metileno ligado à amida aparece como um simpleto por volta de 4,4 ppm, já o hidrogênio referente a imina normalmente possui um deslocamento químico de 6,05 ppm em cadeias alifáticas, porém sua ligação a um anel aromático aparentemente o levou para um campo mais baixo e com relação ao H da amida, este normalmente aparece no intervalo entre 5-9 ppm conforme Pavia e colaboradores (2016), porém devido a sua ligação à imina pode ocorrer uma maior desproteção.

Munir e colaboradores (2021) realizaram a caracterização de um derivado *N*-acilhidrazônico (NAH) e o sinal de hidrogênios metilenos apareceram próximo a 5,14 ppm, NH entre 11,40-12,20 ppm e $\text{N}=\text{CH}$ entre 7,95-8,50 ppm sendo todos os sinais duplicados. O mesmo padrão foi exibido pelo derivado NAH denominado JR-09 que foi usado para o planejamento da série YV, Ramos e colaboradores (2022) relataram que o NH foi identificado como um simpleto em 11,81 ppm e 11,73 ppm, enquanto para $\text{N}=\text{CH}$ os hidrogênios apareceram em 8,00 ppm e 8,16 ppm, já os hidrogênios do grupo metileno se apresentaram como simpletos em 4,21 ppm e 3,81 ppm, como observado todos os sinais demonstraram

duplicidade. Por fim, destaca-se na Tabela 7 as informações relativas aos espectros de RMN de ^1H dos compostos finais.

Tabela 7 – Resultados da análise por RMN ^1H dos compostos finais

Compostos	RMN ^1H (valores em ppm)
YV-01	RMN ^1H (80 MHz, DMSO-d ₆): δH 11.73 (s, NH); 10.48 (d, HC=N); 9.70 (d, HC=N); 8.15 (d, HC=C); 7.73 (m, HC=C); 7.44 (m, HC=C); 7.07 (q, HC=C); 4.97 (s, CH ₂); 4.55 (s, CH ₂);
YV-02	RMN ^1H (80 MHz, DMSO-d ₆): δH 11.73 (s, NH); 10.48 (d, HC=N); 9.71 (d, HC=N); 8.15 (d, HC=C); 7.73 (m, HC=C); 7.44 (m, HC=C); 7.04 (q, HC=C); 4.97 (s, CH ₂); 4.55 (s, CH ₂);
YV-04	RMN ^1H (80 MHz, DMSO-d ₆): δH 11.78 (s, NH); 10.48 (d, HC=N); 9.79 (d, HC=N); 8.14 (d, HC=C); 7.79 (d, HC=C); 7.51 (d, HC=C); 7.04 (m, HC=C); 4.97 (s, CH ₂); 4.45 (s, CH ₂);

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

5.4 Análise do Perfil farmacocinético *in silico* e *druglikeness*

Com o objetivo de identificar de forma preliminar os candidatos a fármaco mais promissores que se enquadram nos critérios de *druglikeness*, a aplicação de estudos *in silico* é utilizada para a predição do perfil farmacocinético e de toxicidade ADME-Tox (Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), sendo uma etapa relevante para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos que pode ser realizada através de plataformas online, como o SwissADME e pkCSM que foram utilizados para avaliação dos compostos YV-01, YV-02, YV-03 e YV-04 (Agoni *et al.*, 2020; Alqahtani, 2017; Kar; Leszczynski, 2020).

A etapa de absorção é determinante na biodisponibilidade, eficácia e via de administração de fármacos e pode estar associada a solubilidade aquosa, lipofilicidade e absorção gastrointestinal. Na Tabela 8, tem-se os dados relativos à solubilidade aquosa dos

compostos híbridos isatínicos hidrazônicos que foram classificados através do método de Ali, seguindo a escala: insolúvel < -10 < -6 < -4 < solúvel < -2 < muito < 0 (Daina; Michielin; Zoete, 2017).

A avaliação da lipofilicidade pelo coeficiente de partição n-octanol/água $\text{Log } P_{o/w}$, levou em consideração os critérios de *druglikeness* estabelecidos por Ghose ($-0.4 \leq \text{WLogP} \leq 5.6$), Egan ($\text{WLogP} \leq 5.88$) e Lipinski ($\text{MLogP} \leq 4,15$ ou $\text{CLogP} \leq 5$) (Egan; Merz.; Baldwin, 2000; Ghose; Viswanadhan; Wendoloski, 1999; Lipinski *et al.*, 1997). Além disso, também foi considerada a permeabilidade em Caco-2 (Linhagem Celular de Adenocarcinoma de Cólon Humano) que permite analisar a capacidade de absorção intestinal e é considerada alta a partir de valores de Coeficiente de Permeabilidade Aparente ($\text{Log } P_{app}$) acima de $0.90 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Pires; Blundell; Ascher, 2015).

Tabela 8 – Perfil de solubilidade aquosa, lipofilicidade, absorção no TGI e permeabilidade Caco-2

	YV-01	YV-02	YV-03	YV-04
Log S (Ali)	-4.96	-5.61	-5.61	-6.27
WLog P	2.92	3.58	3.58	4.23
MLog P	2.39	2.87	2.87	3.34
Absorção no TGI	Alta	Alta	Alta	Alta
Absorção intestinal humana (%)	94.45	93.07	93.07	91.69
Permeabilidade Caco-2 (10^{-6} cm/s)	0.82	0.91	0.91	0.59

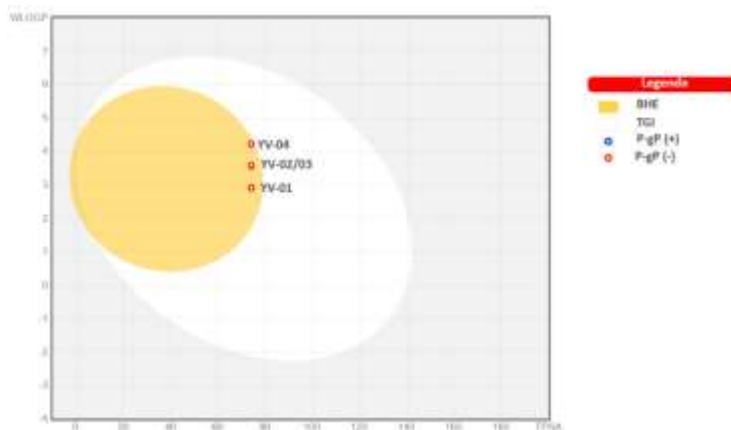
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Os derivados híbridos isatínicos hidrazônicos apresentaram solubilidade aquosa moderada em sua maioria, excetuando-se o YV-04 que demonstrou baixa solubilidade aquosa, em razão da presença de dois átomos de cloro substituídos na posição *para* dos anéis benzênicos. Ainda assim, todos os compostos se enquadraram nos limites de Log P (WLogP e MLogP) estabelecidos por Ghose, Egan e Lipinski, assim como exibiram alta absorção gastrointestinal e porcentagem de absorção intestinal condizente, com valores de 91.69 a 96.45%.

Destaca-se que o YV-01 demonstrou maior potencial de solubilidade aquosa e esperado caráter lipofílico reduzido, resultando em maior porcentagem de absorção intestinal, porém os compostos YV-02 e YV-03 com apenas um átomo de cloro como substituinte exibiram maior equilíbrio e com isso atingiram uma alta absorção intestinal humana (93.07 %) e alta permeabilidade em Caco-2 em relação aos outros compostos avaliados. Enquanto, o YV-04 por apresentar baixa solubilidade aquosa em razão da maior lipofilicidade em relação aos outros compostos, também acarretou menor porcentagem de absorção intestinal humana e intermediária permeabilidade em Caco-2.

O estudo desenvolvido por Egan, Merz, Baldwin (2000) tinha o objetivo de identificar moléculas bem absorvidas/pouco absorvidas, com base nos descritores de polaridade e lipofilicidade, como área superficial polar (PSA) e Log P (ALOGP98), respectivamente. A partir disso foram delineadas regiões específicas elípticas envolvendo moléculas com habilidade de permear a barreira hematoencefálica (BHE) ou com absorção no trato gastrointestinal (TGI) que leva em consideração mecanismos de transporte ativo e de efluxo associados à baixa absorção, sendo conhecido como “Egan egg” que deu origem ao Boiled-Egg, cuja fundamentação consiste na área de superfície polar topológica (TPSA) e o coeficiente de partição n-octanol/água (WLOGP) de Wildman e Crippen (1999). Nesse sentido, o modelo Boiled-Egg é utilizado para a predição da permeabilidade através da BHE, absorção no TGI e suscetibilidade de atuação como substrato da glicoproteína P (P-gP). Na Figura 56 a seguir tem-se a aplicação desse método preditivo aos derivados híbridos isatínicos hidrazônicos.

Figura 56 – Modelo *boiled-egg* dos derivados híbridos isatínicos hidrazônicos



Fonte: Adaptado do SwissADME , 2023.

Destaca-se que a predição *in silico* demonstrou que todos os compostos são lipofílicos e polares o suficiente para poderem atravessar a barreira hematoencefálica e também serem

absorvidos pelo TGI, como mencionado anteriormente e não são substratos da P-gp, facilitando a absorção desses derivados, visto que esta atua no efluxo de xenobióticos através das membranas biológicas, com localização cerebral e no intermédio da parede do TGI e lúmen. A seleção de compostos *drug-like*, ou seja, moléculas que compartilham das propriedades físico-químicas presentes na maioria dos fármacos já conhecidos direcionam a prováveis compostos biologicamente ativos que apresentam potencial terapêutico, através do cumprimento dos critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski (“regra dos 5”), Ghose, Veber e Egan (Egan; Merz.; Baldwin, 2000; Ghose; Viswanadhan; Wendoloski, 1999; Lipinski *et al.*, 1997; Veber *et al.*, 2002) que estão destacados na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros considerados como critérios de *druglikeness*

Parâmetros de <i>druglikeness</i>	
Lipinski	Peso molecular ≤ 500 MLogP $\leq 4,15$ Aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 Doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5
Ghose	$160 \leq \text{Peso molecular} \leq 480$ $-0,4 \leq \text{WLogP} \leq 5,6$ $40 \leq \text{Refratividade molar} \leq 130$ $20 \leq \text{Átomos} \leq 70$
Veber	Ligações rotacionáveis ≤ 10 Área de superfície polar topológica ≤ 140
Egan	WLogP $\leq 5,88$ Área de superfície polar topológica $\leq 131,6$

Fonte: Adaptado de *SwissADME*, 2023.

Entre os compostos avaliados de acordo com os critérios de *druglikeness*, todos se adequaram às regras, apresentando peso molecular entre 382.41 e 451.30 g/mol, lipofilicidade adequada, 4 pontos aceptores de ligação de hidrogênio e um ponto doador de ligação de hidrogênio, 6 ligações rotacionáveis e TPSA de 74.13 Å². Mas foi observado que a refratividade molar aumentou na mesma proporção que se adicionou mais átomos de cloro como substituintes, sendo o menor valor atribuído ao YV-01 (116.15), intermediário para YV-02/YV-03 (121.16) e o maior para o YV-04 (126.17). Isso é justificado pelo aumento da polarizabilidade que é a facilidade de distorção da nuvem eletrônica em razão da eletronegatividade do átomo de cloro. Desse modo, os derivados híbridos isatínicos

hidrazônicos possuem potencial de biodisponibilidade e compartilham das características presentes em fármacos já conhecidos, relacionando-os com provável atividade terapêutica.

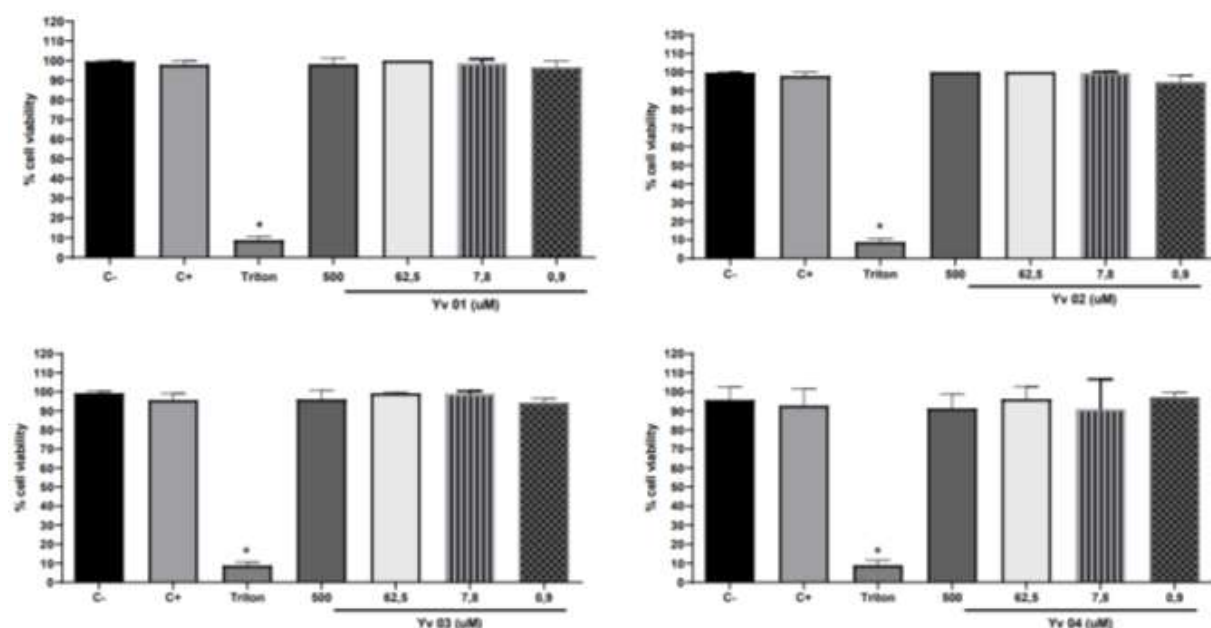
Durante a fase de biotransformação, cerca de 90% das moléculas terapêuticas são substratos de cinco isoformas da CYP450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4), que estão associadas à etapa I do metabolismo de fármacos através da oxidação, cuja inibição exerce influência nas interações medicamentosas, devido ao acúmulo de metabólitos e consequentes efeitos tóxicos (Daina; Michielin; Zoete, 2017; Moroy *et al.*, 2012). Os derivados híbridos isatínicos hidrazônicos exibiram um perfil de inibição das isoformas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4, com exceção da CYP2D6 que constitui uma via alternativa responsável por 30% da metabolização de xenobióticos e é menos reconhecida pelos fármacos devido ao seu polimorfismo. Atualmente, muitos fármacos inclusos na terapêutica estão envolvidos na inibição de isoformas da CYP450 (Manikandan; Nagini, 2018), logo tal perfil não impede a utilização dos derivados híbridos isatínicos hidrazônicos.

A partir da análise do perfil de toxicidade realizada na plataforma online pkCSM, destaca-se que todos os compostos não apresentaram hepatotoxicidade ou sensibilização tópica e apenas o YV-04 foi positivo no teste AMES que é utilizado para determinar o potencial mutagênico de novos produtos químicos e medicamentos. Esse teste consiste em um ensaio de curto prazo que usa cepas de *Salmonella typhimurium* com mutações preexistentes que incapacitam a síntese de um aminoácido essencial (histidina), consequentemente elas não podem crescer e formar colônias em sua ausência. Porém, quando a substância testada é mutagênica essas colônias desenvolvem novas mutações e conseguem crescer na ausência de histidina (Mortelmans; Zeiger, 2000).

5.5 Avaliação da atividade biológica *in vitro*

Inicialmente, foi realizado o ensaio de citotoxicidade com as moléculas YV01-04 para avaliar a viabilidade celular em macrófagos estimulados com LPS+INF- γ , visando determinar as concentrações não citotóxicas dos compostos teste para a realização dos ensaios de dosagens de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico. Os derivados isatínicos hidrazônicos foram testados em dez concentrações que variaram de 0,9 a 500 μ M, na Figura 57, percebe-se que os compostos não apresentaram citotoxicidade nas concentrações avaliadas e o controle positivo (Triton 5%), como esperado, reduziu a viabilidade celular ($p < 0,0001$) Significativamente quando comparado ao grupo C+.

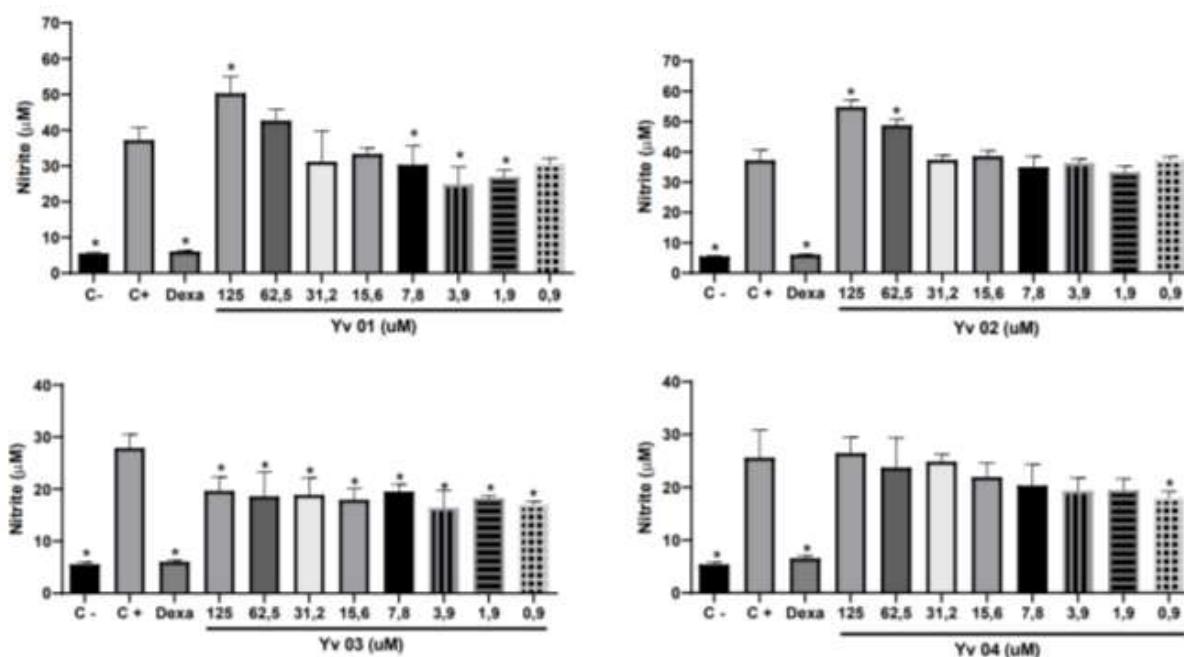
Figura 57 – Efeito dos compostos YV01-04 sobre a viabilidade de macrófagos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Legenda: Veículo (C+) ou Triton 5%, o grupo C- representa células não estimuladas e não tratadas. Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão. *Diferente do grupo C+ ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Com o objetivo de analisar a capacidade dos compostos de inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados foi realizado o teste de nitrito pelo método de Griess, em que ocorre uma reação de diazotização entre uma amina aromática e nitrito, cujo acoplamento do produto forma um azocromóforo e óxido nítrico (Green *et al.*, 1982), logo a quantificação de nitrito com o sobrenadante de cultura de macrófagos, é um indicativo dos níveis de óxido nítrico. A Figura 58 mostra a concentração de nitrito presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS+INF- γ e tratados com os compostos nas concentrações de 0,9 a 125 μ M, tendo a dexametasona (Dexa; 10 μ M) como padrão ouro. Cujos resultados indicam que YV01 nas concentrações de 7,8 3,9 e 1,9 μ M reduziu a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados, enquanto à 125 μ M aumentou os níveis de NO na cultura ($p < 0,05$). Como esperado, a dexametasona, utilizada como droga de referência no teste, reduziu os níveis de nitrito na cultura ($p < 0,05$).

Figura 58 – Efeito dos compostos YV01-04 sobre a viabilidade de macrófagos

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Legenda: O eixo X representa os diferentes tratamentos. O eixo Y representa os níveis de nitrito no sobrenadante da cultura. As culturas foram estimuladas com LPS+INF- γ e tratadas com veículo (C+; grupo controle, DMSO 5% em salina), compostos teste em concentrações de 0,9 a 125 μ M, e dexametasona (Dexa, 10 μ M, droga de referência). O grupo C- representa células não estimuladas e não tratadas. Dados representados por média \pm DP, realizados em triplicatas. Os dados foram analisados por one way ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado com o grupo C+.

Assim como o YV-01, o composto YV-02 em suas concentrações mais altas (125 e 62,5 μ M) estimulou, significativamente, a produção de NO na cultura ($p < 0,05$). Enquanto, o YV-03 reduziu a produção de NO pelos macrófagos estimulados ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas. Por fim, o derivado YV-04 reduziu a produção de NO pelos macrófagos apenas na concentração de 0,9 μ M ($p < 0,05$). Desse modo, conclui-se que os compostos avaliados apresentaram baixa citotoxicidade e entre eles é possível que YV-03 tenha potencial anti-inflamatório, também podendo ser explorado sua influência na patogênese da asma, considerando que o NO regula a função mucociliar e frequência ciliar, transporte de íons epiteliais, restauração da disfunção de barreira após lesão por processos de reparo de feridas, e modulação da produção de mediadores inflamatórios no epitélio respiratório (Bayarri et al., 2021). Entretanto, problemas de solubilização dos derivados isatínicos hidrazônicos limitaram a confiabilidade desses resultados, requerendo repetição para confirmação, bem como a execução da análise de inibição de citocinas como TNF- α e IL-1 β .

5.6 Simulações de dinâmica molecular (DM)

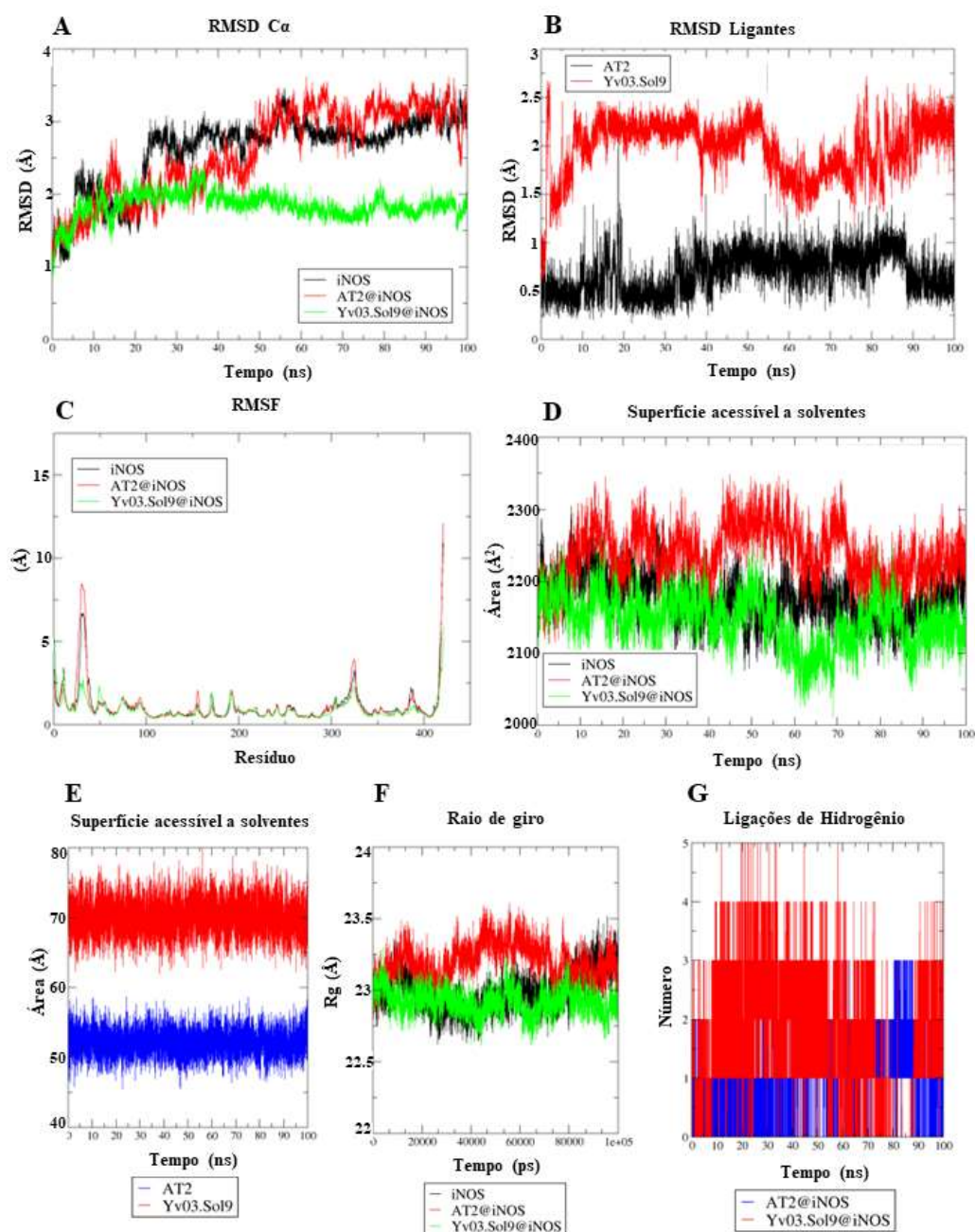
Conforme demonstrado pelos estudos de ancoragem molecular, o composto YV-03 apresentou melhor potencial anti-inflamatório entre os derivados avaliados, dessa forma o complexo formado entre o YV-03 e o alvo iNOS foi selecionado para a análise de dinâmica molecular visando sugerir um possível mecanismo de ação. Na Figura 59, tem-se os gráficos de RMSD, flutuação quadrática média (RMSF), raio de giro (Rg) que demonstram a estabilidade e compactação do complexo. Acompanhados dos gráficos da área de superfície acessível a solventes (SASA) que é indicativo da permanência do ligante no ambiente hidrofóbico da proteína ou mais acessível ao solvente, por fim, também destaca-se a quantidade de ligações de hidrogênio formadas durante a simulação de 100 ns, que está associado à estabilidade do complexo (Idris *et al.*, 2021; Ishak *et al.*, 2017; Lobanov; Bogatyreva; Galzitskaya, 2008; Savojardo *et al.*, 2021).

No gráfico do RMSD de C α (Imagem A – Figura 59), a partir de 50 ns foi observada a estabilização tanto da Apo-proteína e complexos avaliados (com ligante cocrystalizado e YV-03), porém percebe-se que o complexo com o ligante cocrystalizado AR-C95791 não modifica a estabilidade do alvo em comparação à forma apo e o YV-03 forma um complexo mais estável. Ao comparar o RMSD apenas dos ligantes AR-C95791 e YV-03 (Imagem B – Figura 59) nota-se uma proximidade entre ambos. O gráfico de Rg (Imagem F – Figura 59) é condizente com os resultados anteriores, além de exibir a linearidade dos complexos e forma apo, confirma que o complexo com o YV-03 é mais compacto em relação ao ligante cocrystalizado.

Dentre as regiões que apresentaram flutuações no gráfico de RMSF (Imagem C – Figura 59), o intervalo 380-400, envolve resíduos importantes para a inibição do alvo, como Arg³⁸⁸, Asn²⁸³, Phe²⁸⁶, porém o complexo iNOS-YV03 se manteve mais estável enquanto a forma apo e o complexo com o ligante cocrystalizado exibiram flutuações de até 2.5 Å. Tendo em vista que a estabilidade do complexo após a simulação de DM é um parâmetro importante para avaliar se a molécula pode apresentar afinidade pelo sítio ativo (Kumar, Ankur *et al.*, 2018), logo o YV-03 apresentou maior afinidade de acordo com os dados mencionados anteriormente.

Em seguida, os gráficos de SASA (Imagens D e E – Figura 59) apontam proximidade entre os complexos e forma apo. Na comparação entre o YV-03 e o ligante cocrystalizado, nota-se que o YV-03 apresentou maior exposição ao solvente, sugere-se que isso ocorre devido a diferença de tamanho entre as moléculas (YV03 e AR-C95791), porém os resultados complementares demonstram que não afetou seu desempenho.

Figura 59 – Resultados da simulação de dinâmica molecular no iNOS: A) RMSD de C α , B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D/E) SASA, F) Rg e G) Ligações de hidrogênio



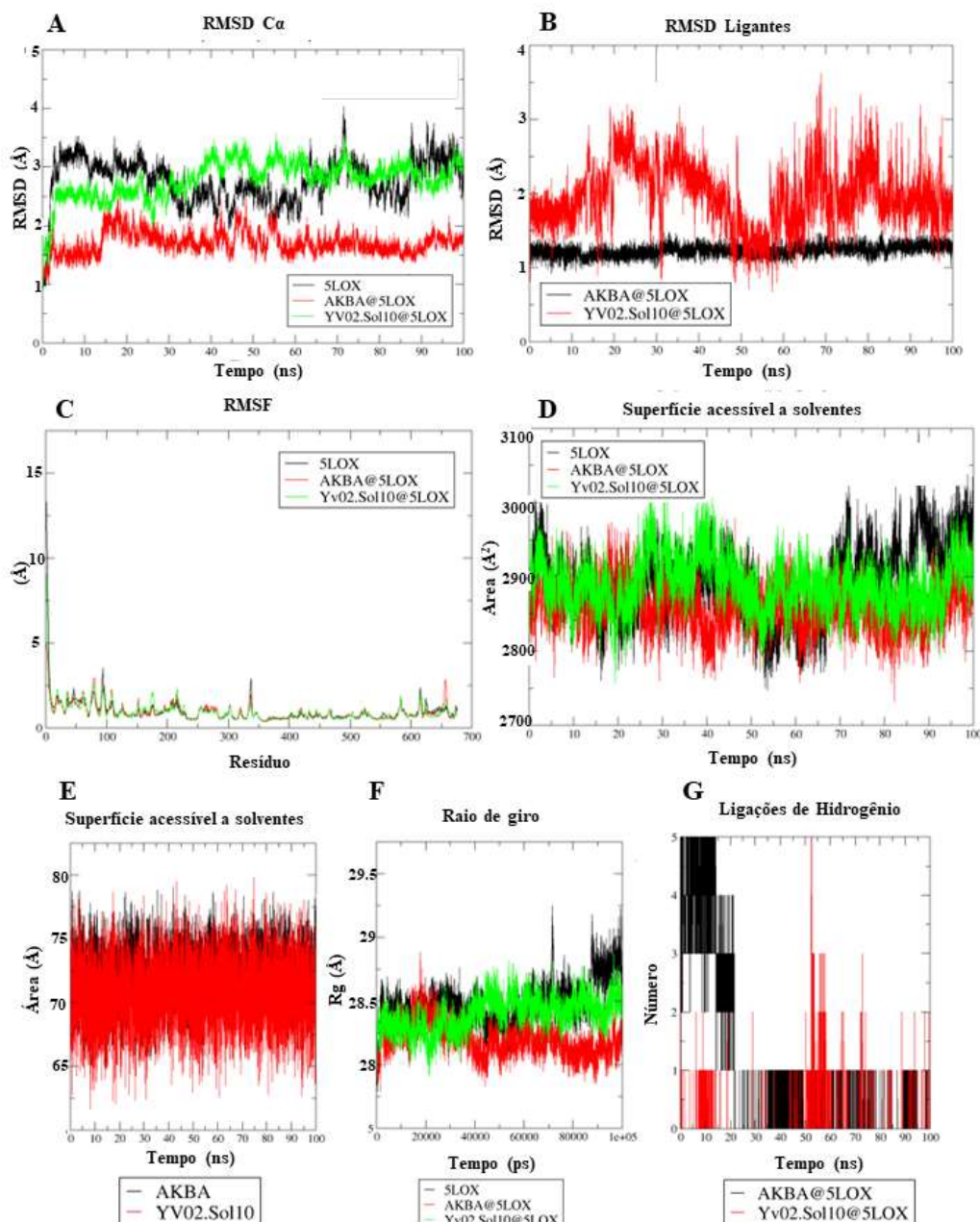
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Durante a simulação, o YV03 além de estabelecer até 5 ligações de hidrogênio em complexo com iNOS também apresentou maior quantidade de ligações, enquanto o AR-C95791 só exibiu até 3 ligações (Imagem G – Figura 59), corroborando para a maior estabilidade do complexo iNOS-YV03.

De acordo com os estudos de ancoragem molecular em alvos com potencial antiasmático, o derivado YV-02 foi o melhor em todos, dentre estes a 5-LOX foi selecionada

para a simulação de dinâmica molecular com duração de 100 ns, cujos resultados estão descritos na Figura 60.

Figura 60 – Resultados da simulação de dinâmica molecular na 5-LOX: A) RMSD de C α , B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D/E) SASA, F) Rg e G) Ligações de hidrogênio

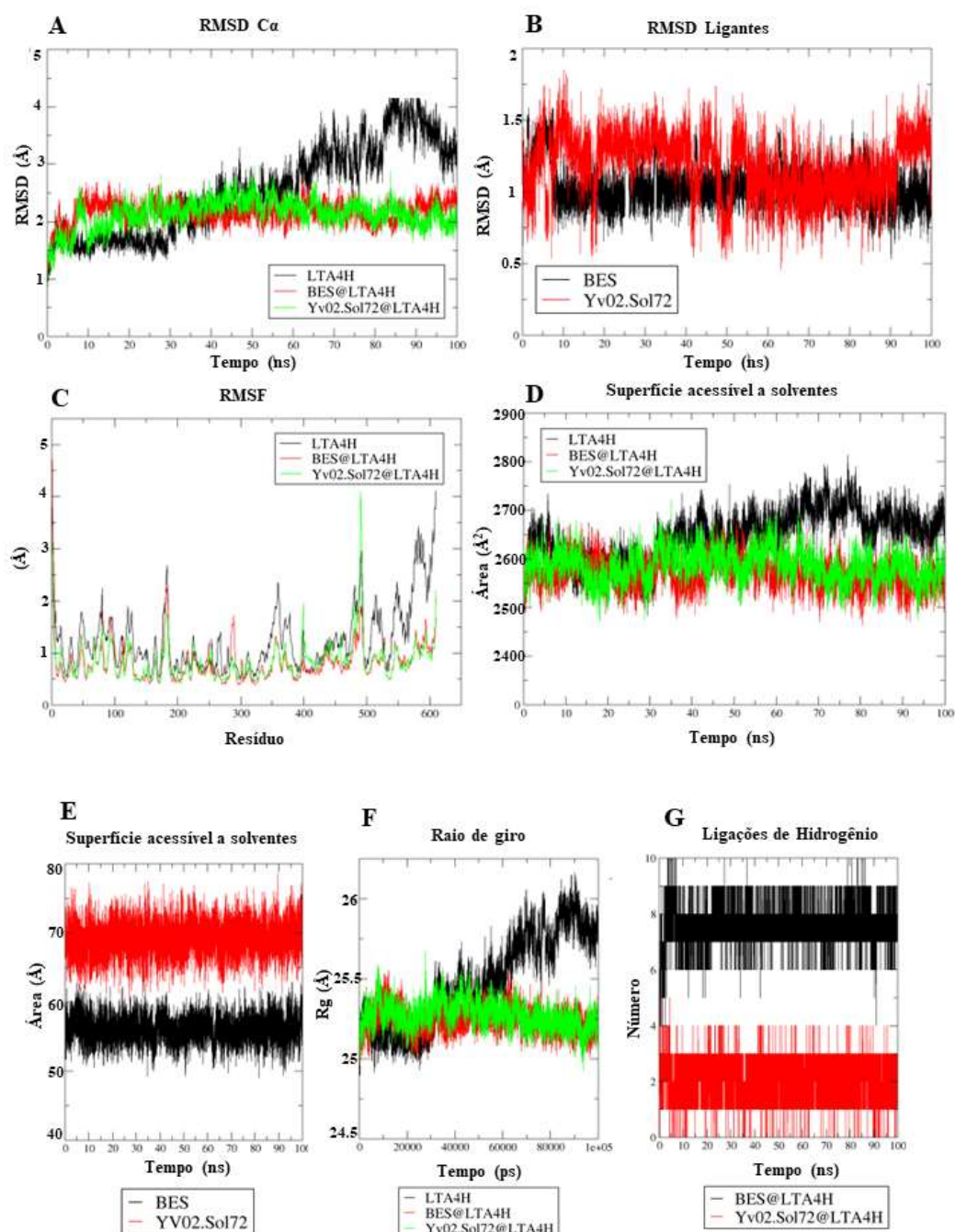


Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Conforme observado na Figura 60, os gráficos de RMSD C α e dos ligantes (Imagens A e B – Figura 60) indicam que o ligante cocrystalizado AKBA apresentou maior estabilidade que o YV-02 em complexo com a 5-LOX e em relação à sua forma apo, essa informação é complementada pelo maior número de ligações de hidrogênio estabelecidas pelo AKBA quando

comparado ao YV-02 (Imagem G – Figura 60). Enquanto os demais gráficos, Rg e SASA (Imagens D, E e F – Figura 60) destacaram um padrão similar de compactação e exposição ao solvente. Por fim, o RMSF (Imagem C – Figura 60) indicou que apenas Leu⁶⁶ se enquadrou nas flutuações observadas nos intervalos 0-100, 300-350 e 475-675, demonstrando a estabilidade associada aos demais resíduos importantes para a inibição do alvo. O conjunto dos resultados apontam que o possível mecanismo do YV-02 não está relacionado ao alvo 5-LOX. Desse modo, o próximo alvo analisado por simulação de dinâmica molecular (100 ns) foi o LTA4H, com resultados exibidos a seguir na Figura 61.

Figura 61 – Resultados da simulação de dinâmica molecular na LTA₄H: A) RMSD de C α , B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D) Rg, E) SASA e F) Ligações de hidrogênio



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Com base nos resultados exibidos na Figura 61, os complexos bestatina-LTA₄H e YV02-LTA₄H apresentaram estabilidade semelhante entre si e melhor em comparação à forma apo de acordo com RMSD de C α e o RMSD dos ligantes (Imagens A e B – Figura 61) corrobora com esse resultado. O RMSF (Imagem C – Figura 61) mostrou flutuações de 2.0-4.0 Å nos intervalos 170-195, 390-410 e 475-500 que não englobam os resíduos de reconhecimento de

LTA₄ (Arg⁵⁶³ e Lys⁵⁶⁵), domínio catalítico (His²⁹⁵, His²⁹⁹ e Glu³¹⁸), clivagem peptídica (Glu²⁹⁶ e Tyr³⁸³) ou do bolsão hidrofílico (Gln¹³⁴, Asp³⁷⁵ e Tyr²⁶⁷) que são importantes para a inibição do alvo. Adicionalmente, foi notada uma similaridade nos gráficos de SASA e Rg (Imagens D, E e F – Figura 61) com relação aos ligantes, diferindo apenas na quantidade de ligações de hidrogênio (Imagem G – Figura 61), visto que a bestatina desenvolveu uma maior quantidade de interações durante a simulação de 100 ns. Sendo assim, sugere-se que o mecanismo do YV-02 está relacionado ao alvo LTA₄H, atuando de forma semelhante ao inibidor do alvo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os derivados isatícos hidrazônicos foram planejados por hibridação e substituição no anel benzeno baseando-se na árvore de decisão de Topliss por bioisosterismo, os quatro compostos apresentaram bons resultados na análise do perfil anti-inflamatório e antiasmático através de ancoragem molecular, com destaque para o YV-03 nos alvos de inflamação e o YV-02 para os alvos de asma.

Por este motivo, todos os compostos foram selecionados para a síntese, obtendo bons rendimentos que sinalizaram uma rota sintética adequada. Posteriormente, as propriedades físico-químicas foram analisadas e realizou-se uma caracterização estrutural preliminar por espectroscopia de IV e RMN ^1H , que exibiram resultados compatíveis com as moléculas planejadas.

Analizou-se o perfil farmacocinético e de toxicidade (ADME-Tox) *in silico* para avaliar a influência das substituições realizadas e como esperado, o YV-02 e YV-03 apresentaram maior equilíbrio lipofílico quando comparado ao YV-04, sendo moderadamente solúveis em água. E quando comparados ao YV-01, demonstraram melhor permeabilidade *in silico*. Os compostos não apresentaram hepatotoxicidade ou sensibilização tópica e apenas o YV-04 demonstrou potencial mutagênico. Por fim, todos os compostos se enquadraram nas regras de druglikeness, demonstrando potencial como candidatos a fármaco.

Em estudos *in vitro*, observou-se que os compostos apresentaram baixa citotoxicidade em macrófagos estimulados com LPS+INF- γ e entre eles é possível que YV-03 tenha potencial anti-inflamatório, pela redução dos níveis de nitrito em todas as concentrações testadas.

Tendo em vista que o YV-03 também foi o melhor composto na ancoragem molecular no alvo iNOS, foi selecionado para a simulação de dinâmica molecular, cujos resultados sugerem que seu mecanismo de ação envolva a inibição de iNOS. Por meio da adição de um átomo de cloro na posição fenilimino do *scaffold*, tem-se a modulação do possível mecanismo, com o YV-02 que se destacou para a atividade antiasmática e de acordo com as simulações de dinâmica molecular ele pode atuar na inibição do alvo LTA $_4$ H.

Tem-se como perspectiva realizar os RMNs (^1H e ^{13}C) de 600 MHz, que possui uma melhor resolução e dessa forma identificar mais detalhes referentes à caracterização estrutural e confirmação da existência de estereoisômeros, somado a obtenção do espectro de massas das moléculas finais. Bem como, refazer os testes *in vitro* referentes a atividade anti-inflamatória e adicionar a análise da inibição de citocinas como TNF- α e IL-1 β . No doutorado, pretende-se dar continuidade em modelos *in vivo* para inflamação e asma.

REFERÊNCIAS

- AARJANE, Mohammed *et al.* Synthesis, antibacterial evaluation, in silico ADMET and molecular docking studies of new N-acylhydrazone derivatives from acridone. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n. 7, p. 6236–6245, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.05.034>>.
- ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*. [S.l.]: Veterinary World. , 15 maio 2018
- AGONI, Clement *et al.* Druggability and drug-likeness concepts in drug design: are biomodelling and predictive tools having their say? *Journal of Molecular Modeling*, v. 26, n. 6, p. 120, 8 jun. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00894-020-04385-6>>.
- AHMADI, Mohsen *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs: recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors. *RSC Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 5, p. 471–496, 2022.
- ALQAHTANI, Saeed. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 13, n. 11, p. 1147–1158, 2 nov. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2017.1389897>>.
- BACCHI, S *et al.* Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs : A Review. p. 52–64, 2012.
- BARNIG, Cindy; FROSSARD, Nelly; LEVY, Bruce D. *Towards targeting resolution pathways of airway inflammation in asthma. Pharmacology and Therapeutics*. [S.l.]: Elsevier Inc. , 1 jun. 2018
- BAYARRI, María Amparo *et al.* Nitric Oxide System and Bronchial Epithelium: More Than a Barrier. *Frontiers in Physiology*, v. 12, n. June, p. 1–20, 2021.
- BELL, Eric W.; ZHANG, Yang. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *Journal of Cheminformatics*, v. 11, n. 1, 2019.
- CAIMMI, Davide; DEMOLY, Pascal. A review of allergen immunotherapy in asthma. *Allergy and Asthma Proceedings*, v. 43, n. 4, p. 310–313, 2022.
- CARVALHO, Wilson Andrade; CARVALHO, Rosemary Duarte Sales; RIOS-SANTOS, Fabrício. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 54, n. 3, p. 448–464, 2004.
- CHAHAL, Sandhya *et al.* Design and Development of COX-II Inhibitors: Current Scenario and Future Perspective. *ACS Omega*, 2023.
- CHINNASAMY, Rajaram Prakash; SUNDARARAJAN, Raja; GOVINDARAJ, Saravanan. Synthesis, characterization, and analgesic activity of novel schiff base of isatin derivatives. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, v. 1, n. 3, p. 342–347, 2010.
- CINELLI, Maris A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and

inhibition. *Medicinal Research Reviews*, v. 40, n. 1, p. 158–189, 2020.

CINGI, Cemal *et al.* Antileukotrienes in Upper Airway Inflammatory Diseases. *Current Allergy and Asthma Reports*. [S.l.]: Current Medicine Group LLC 1. , 28 nov. 2015

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, n. October 2016, p. 1–13, 2017.

DANTAS, L. L.S.F.R. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the isatin derivative (Z)-2-(5-chloro-2-oxoindolin-3-ylidene)-n-phenyl-hydrazinecarbothioamide in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 53, n. 10, p. 1–8, 2020.

DE LIMA PORTO RAMOS, Katharina Rodrigues *et al.* Effects of Acylhydrazone Derivatives on Experimental Pulmonary Inflammation by Chemical Sensitization. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 2, p. 135–151, jun. 2022. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/207127/article>>.

DEKKER, Carien *et al.* Crystal Structure of NLRP3 NACHT Domain With an Inhibitor Defines Mechanism of Inflammasome Inhibition. v. 433, 2021.

DONG, Jianshu *et al.* Insights into human eNOS , nNOS and iNOS structures and medicinal indications from statistical analyses of their. v. 9, n. 3, p. 159–175, 2023.

DOS SANTOS NASCIMENTO, Igor José; DE AQUINO, Thiago Mendonça; DA SILVA JÚNIOR, Edeildo Ferreira. Computer-Aided Drug Design of Anti-inflammatory Agents Targeting Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 (mPGES-1). *Current Medicinal Chemistry*, v. 29, n. 33, p. 5397–5419, 2022.

DOYTCHINOVA, Irini. Drug Design—Past, Present, Future. 2022.

EGAN, William J.; MERZ, Kenneth M.; BALDWIN, John J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 1 out. 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm000292e>>.

ESPÍRITO-SANTO, Renan Fernandes *et al.* The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and in vivo approaches. *PLOS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0179174, 8 jun. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0179174>>.

FURMAN, David *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>>.

GARCIN, Elsa D. *et al.* Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase. *Nature Chemical Biology*, v. 4, n. 11, p. 700–707, 2008.

GHOSE, Arup K.; VISWANADHAN, Vellarkad N.; WENDOLOSKI, John J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases.

Journal of Combinatorial Chemistry, v. 1, n. 1, p. 55–68, 12 jan. 1999. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cc9800071>>.

GILBERT, Nathaniel C *et al.* Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nature Chemical Biology*, v. 16, n. 7, p. 783–790, 11 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41589-020-0544-7>>.

GREEN, Laura C *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000326978290118X>>.

HAMMAD, Hamida; LAMBRECHT, Bart N. *The basic immunology of asthma*. Cell. [S.l.]: Elsevier B.V. , 18 mar. 2021

HANSCH, Corwin. A Quantitative Approach to Biochemical Structure-Activity Relationships. v. 1519, p. 232–239, 1967.

HOLGATE, Stephen T. *et al.* Asthma. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 1, n. September, p. 1–22, 2015.

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>>.

IDRIS, Mukhtar Oluwaseun *et al.* Computer-aided screening for potential TMPRSS2 inhibitors: a combination of pharmacophore modeling, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 39, n. 15, p. 5638–5656, 13 out. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1792346>>.

ISHAK, Siti Nor Hasmah *et al.* Molecular dynamic simulation of space and earth-grown crystal structures of thermostable T1 lipase *geobacillus zalihae* revealed a better structure. *Molecules*, v. 22, n. 10, p. 1–13, 2017.

JEGERSCHÖLD, Caroline *et al.* Structural basis for induced formation of the inflammatory mediator prostaglandin E2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 32, p. 11110–11115, 2008.

KANDASAMY, R. *et al.* Isatin down-regulates expression of atrial natriuretic peptide receptor A and inhibits airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *International Immunopharmacology*, v. 10, n. 2, p. 218–225, fev. 2010.

KAR, Supratik; LESZCZYNSKI, Jerzy. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 15, n. 12, p. 1473–1487, 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1798926>>.

KAUR, Rajbir; RANI, Sudesh; SINGH, Palwinder. Structure and ligand based design for identification of highly potent molecules against 5-LOX. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 94, n. August, p. 129448, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129448>>.

KHALID, Seher; SUMRRA, Sajjad Hussain; CHOCHAN, Zahid Hussain. Isatin endowed metal chelates as antibacterial and antifungal agents. *Sains Malaysiana*, v. 49, n. 8, p. 1889–1904, 2020.

KIRSCH, Philine *et al.* Concepts and Core Principles of Fragment-Based Drug Design. *Molecules*, v. 24, n. 23, p. 4309, 26 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/23/4309>>.

KOEBERLE, Andreas; LAUFER, Stefan A.; WERZ, Oliver. Design and Development of Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 Inhibitors: Challenges and Future Directions. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, n. 13, p. 5970–5986, 2016.

KUMAR, Ankur *et al.* Hydroxychloroquine Inhibits Zika Virus NS2B-NS3 Protease. *ACS Omega*, v. 3, n. 12, p. 18132–18141, 2018.

KUMAR, Halmuthur M Sampath; HERRMANN, Lars; TSOGOEVA, Svetlana B. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Structural hybridization as a facile approach to new drug candidates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 30, n. 23, p. 127514, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127514>>.

KWAH, Jason H.; PETERS, Anju T. Asthma in adults: Principles of treatment. *Allergy and Asthma Proceedings*, v. 40, n. 6, p. 396–402, 1 nov. 2019.

LEUTI, Alessandro *et al.* Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 159, p. 133–169, 2020.

LIN, Sheng-Chieh; SHI, Li-Shian; YE, Yi-Ling. Advanced Molecular Knowledge of Therapeutic Drugs and Natural Products Focusing on Inflammatory Cytokines in Asthma. *Cells*, v. 8, n. 7, p. 685, 5 jul. 2019.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X96004231>>.

LIU, Min; YOKOMIZO, Takehiko. The role of leukotrienes in allergic diseases. *Allergology International*, v. 64, n. 1, p. 17–26, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2014.09.001>>.

LIU, Xuewei *et al.* Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 13, n. 1, p. 23–37, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1403419>>.

LOBANOV, M. Yu; BOGATYREVA, N. S.; GALZITSKAYA, O. V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*, v. 42, n. 4, p. 623–628, 2008.

LUGININA, Aleksandra *et al.* Structure-based mechanism of cysteinyl leukotriene receptor inhibition by antiasthmatic drugs. *Science Advances*, v. 5, n. 10, p. 1–10, 2019.

MANIKANDAN, Palrasu; NAGINI, Siddavaram. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*, v. 19, n. 1, p. 38–54, 5 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/149505/article>>.

MARHOON, Zainab Al *et al.* Synthesis of Phenylcarbamic Acid and 2-[2-Oxo-3-(4-substituted phenylimino)- indolin-1-yl]acetohydrazide Derivatives as Promising Antifungal Agents. *Asian Journal of Chemistry*, v. 26, n. 22, p. 7665–7672, jul. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187853522030188X>>.

MIMS, James W. Asthma: Definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy and Rhinology*, v. 5, n. September, p. S2–S6, 2015.

MITTAL, Anshika; KAKKAR, Rita. Nitric Oxide Synthases and Their Inhibitors: A Review. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 2020, n. 17, p. 228–252, 2020.

MOROY, Gautier *et al.* Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 17, n. 1–2, p. 44–55, jan. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135964461100362X>>.

MORTELMANS, Kristien; ZEIGER, Errol. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, nov. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510700000646>>.

MUNIR, Rubina *et al.* Synthesis of Novel N -Acyhydrazones and Their C-N/N-N Bond Conformational Characterization by NMR Spectroscopy. v. 26, n. 4908, p. 1–18, 2021.

OLIN, J. T.; WECHSLER, Michael E. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. *BMJ*, v. 349, p. g5517, 24 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.g5517>>.

OPRETZKA, Luiza Carolina França *et al.* Natural chromones as potential anti-inflammatory agents: Pharmacological properties and related mechanisms. *International Immunopharmacology*, v. 72, n. October 2018, p. 31–39, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576918310221>>.

PIRES, Douglas E.V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015.

RAO, P N Praveen; KNAUS, Edward E. *Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond*. *J Pharm Pharmaceut Sci* (www.cspsCanada.org). [S.l: s.n.], 2008.

SAVOJARDO, Castrense *et al.* Solvent Accessibility of Residues Undergoing Pathogenic Variations in Humans: From Protein Structures to Protein Sequences. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 7, n. January, p. 1–9, 7 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.626363/full>>.

SINNIAH, Ajantha; YAZID, Samia; FLOWER, Rod J. From NSAIDs to glucocorticoids and

beyond. *Cells*, v. 10, n. 12, 2021.

SJÖGREN, Tove *et al.* Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 10, p. 3806–3811, 2013.

SMITH, William L; DEWITT, David L.; GARAVITO, R Michael. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, v. 69, n. 1, p. 145–182, jun. 2000. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>>.

STEPHENSON, Laurel. Monoclonal antibody therapy for asthma. *Clinical Pulmonary Medicine*, v. 24, n. 6, p. 250–257, 2017.

TASNEEM, Shumaila *et al.* Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological Research*, v. 139, n. June 2018, p. 126–140, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.001>>.

THULASINGAM, Madhuranayaki; HAEGGSTRÖM, Jesper Z. Integral membrane enzymes in eicosanoid metabolism: Structures, mechanisms and inhibitor design. *Journal of Molecular Biology*, v. 432, n. 18, p. 4999–5022, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.020>>.

THUNNISSEN, Marjolein M.G.M.; NORDLUND, Pär; HAEGGSTRÖM, Jesper Z. Crystal structure of human leukotriene A4 hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nature Structural Biology*, v. 8, n. 2, p. 131–135, 2001.

TOPLISS, John G. Utilization of Operational Schemes for Analog Synthesis in Drug Design. v. 15, n. 10, p. 1006–1011, 1972.

TRINH, Hoang Kim Tu *et al.* *Asthma pharmacotherapy: an update on leukotriene treatments. Expert Review of Respiratory Medicine*. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 2 dez. 2019

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 38, n. 1, p. 97–120, abr. 1998. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97>>.

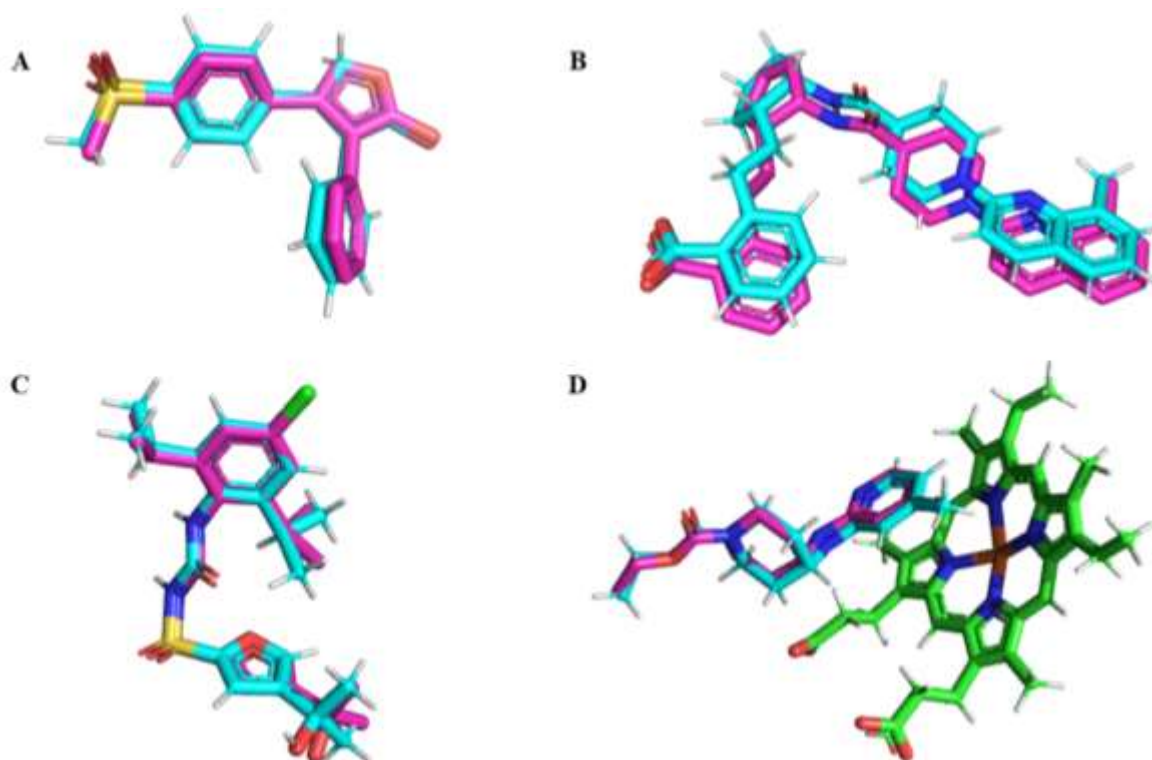
VEBER, Daniel F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 1 jun. 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm020017n>>.

WILDMAN, Scott A.; CRIPPEN, Gordon M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 39, n. 5, p. 868–873, 27 set. 1999. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci990307l>>.
ZHANG, Wenming *et al.* Impact of allergen immunotherapy in allergic asthma. *Immunotherapy*, v. 10, n. 7, p. 579–593, 2018.

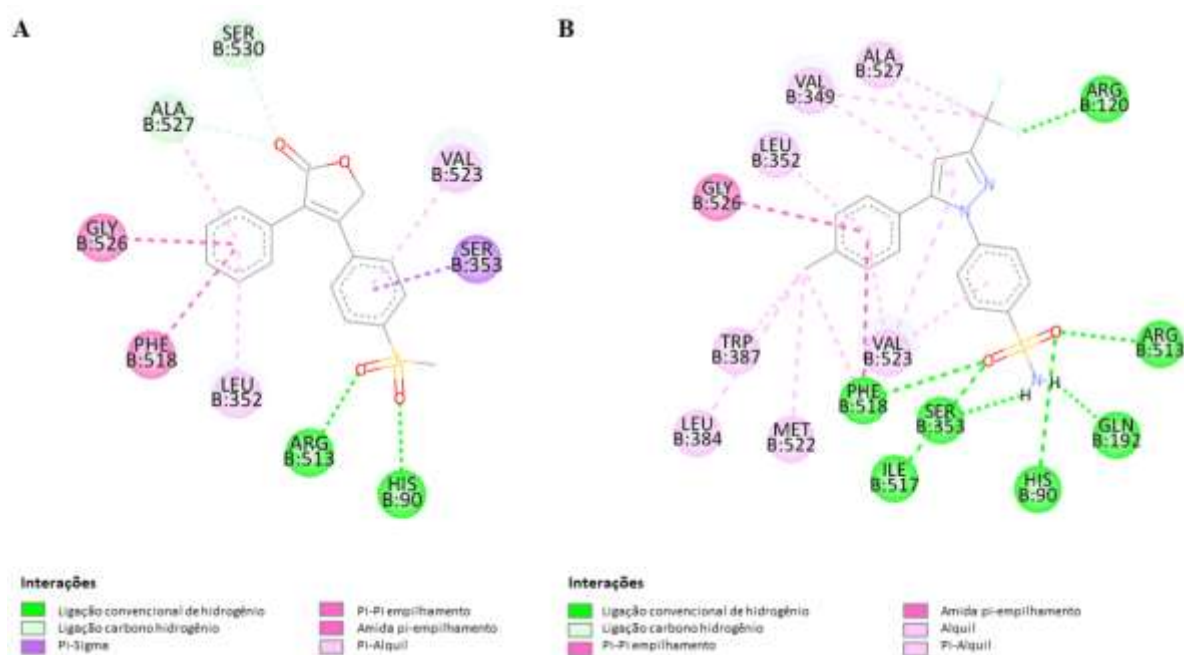
ZHANG, Yan Yu *et al.* Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and its inhibitors: Molecular mechanisms and therapeutic significance. *Pharmacological Research*, v. 175, n. October 2021, p. 105977, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105977>>.

ZHANG, Yue *et al.* Application of Computational Biology and Artificial Intelligence in Drug Design. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 21, 2022.

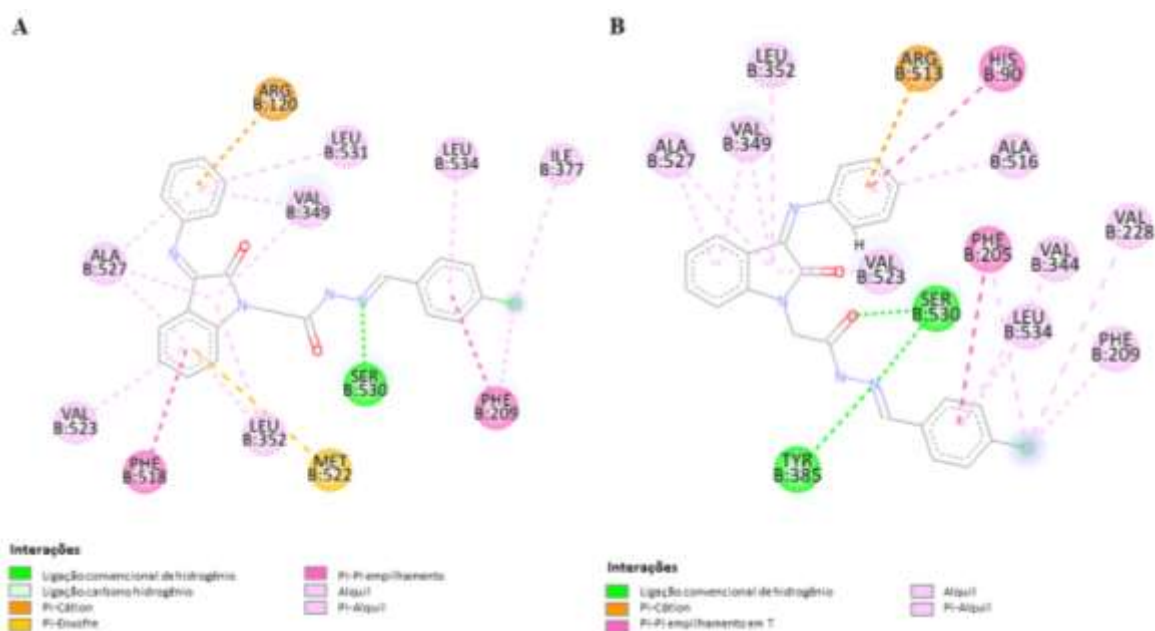
APÊNDICE A – Sobreposição da pose de *redocking* e ligante cocrystalizado: COX-2
(A), mPGES-1 (B), NLRP3 (C) e iNOS (D)



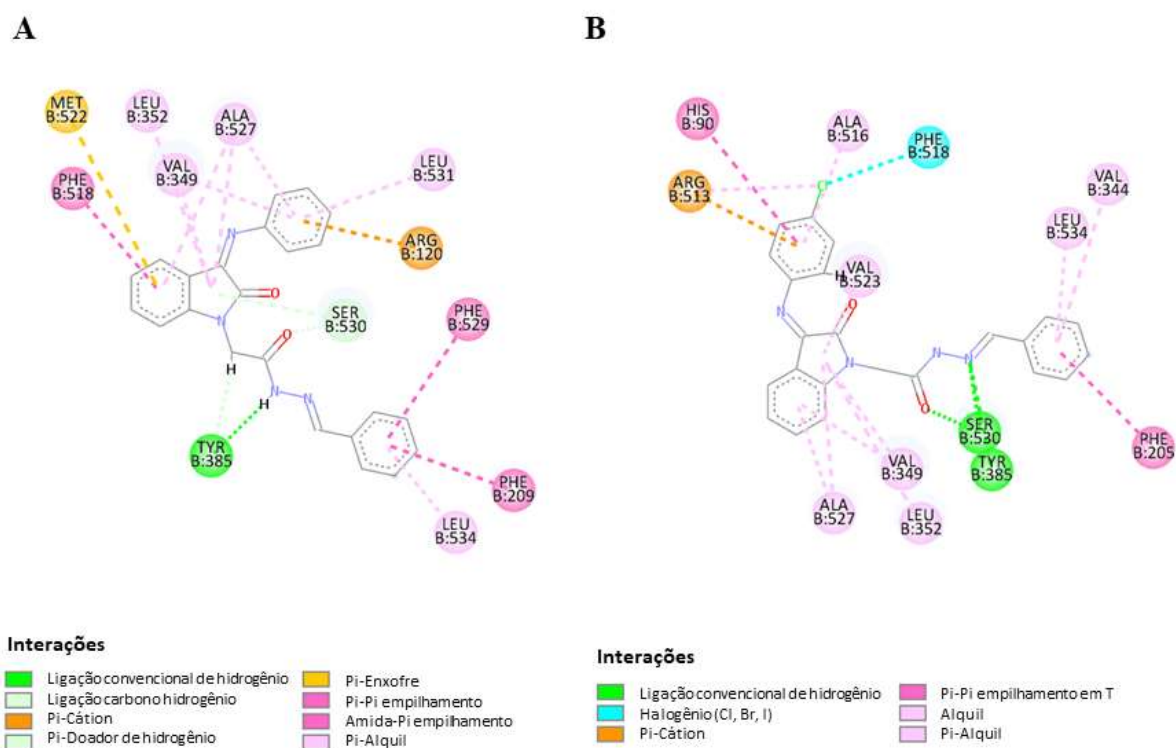
Representação das interações do Rofecoxibe (A) e Celecoxibe (B) na COX-2



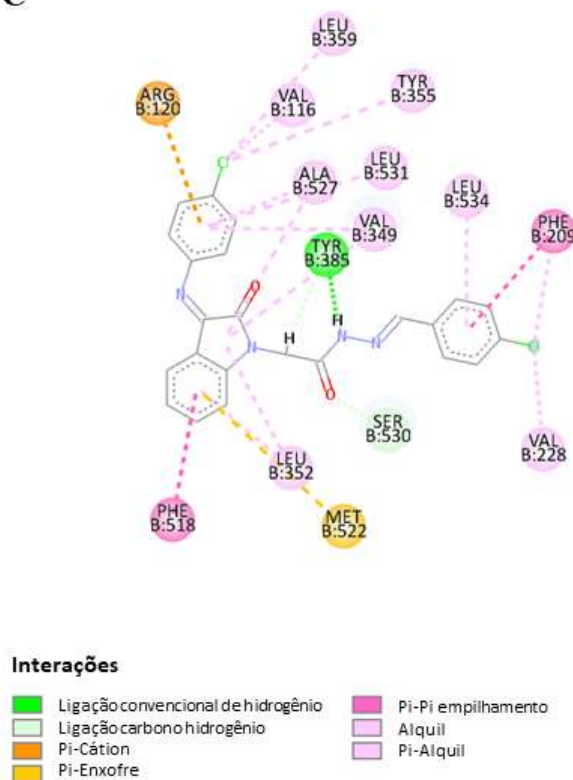
Representação das interações das poses 21 (A) e 9 (B) do YV-03 na COX-2



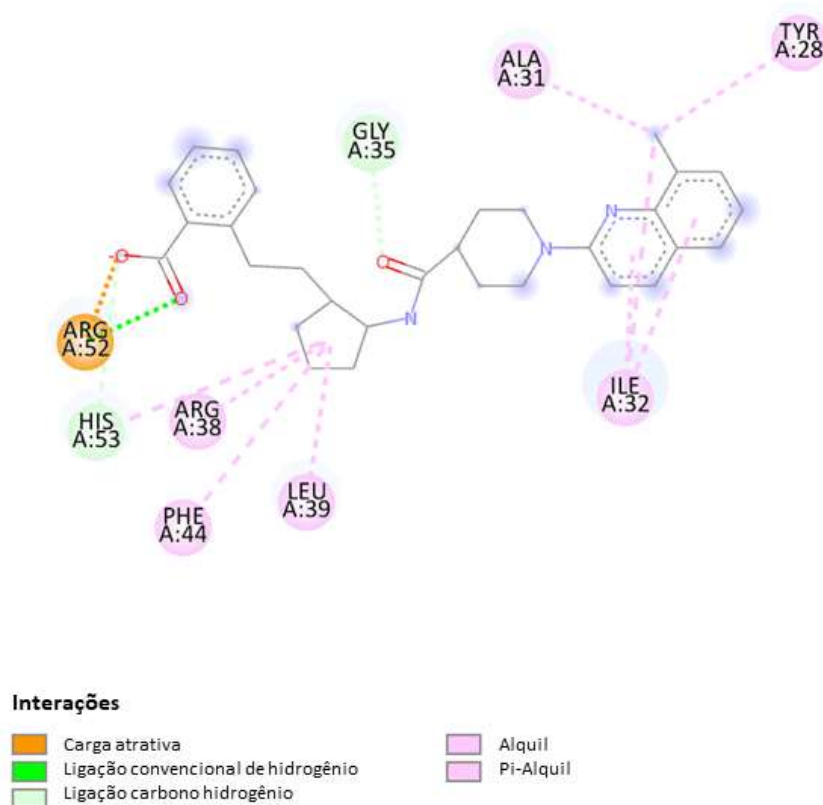
Representação das interações do YV-01 (A), YV-02 (B) e YV-04 (C) na COX-2



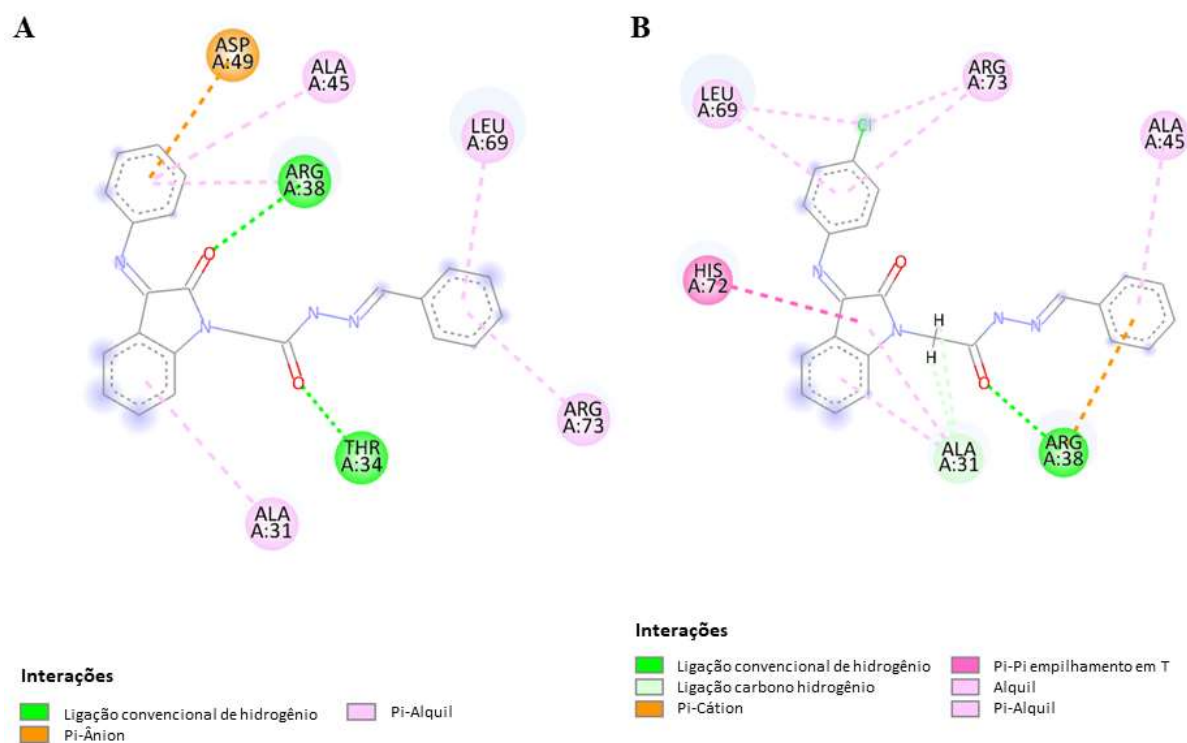
C



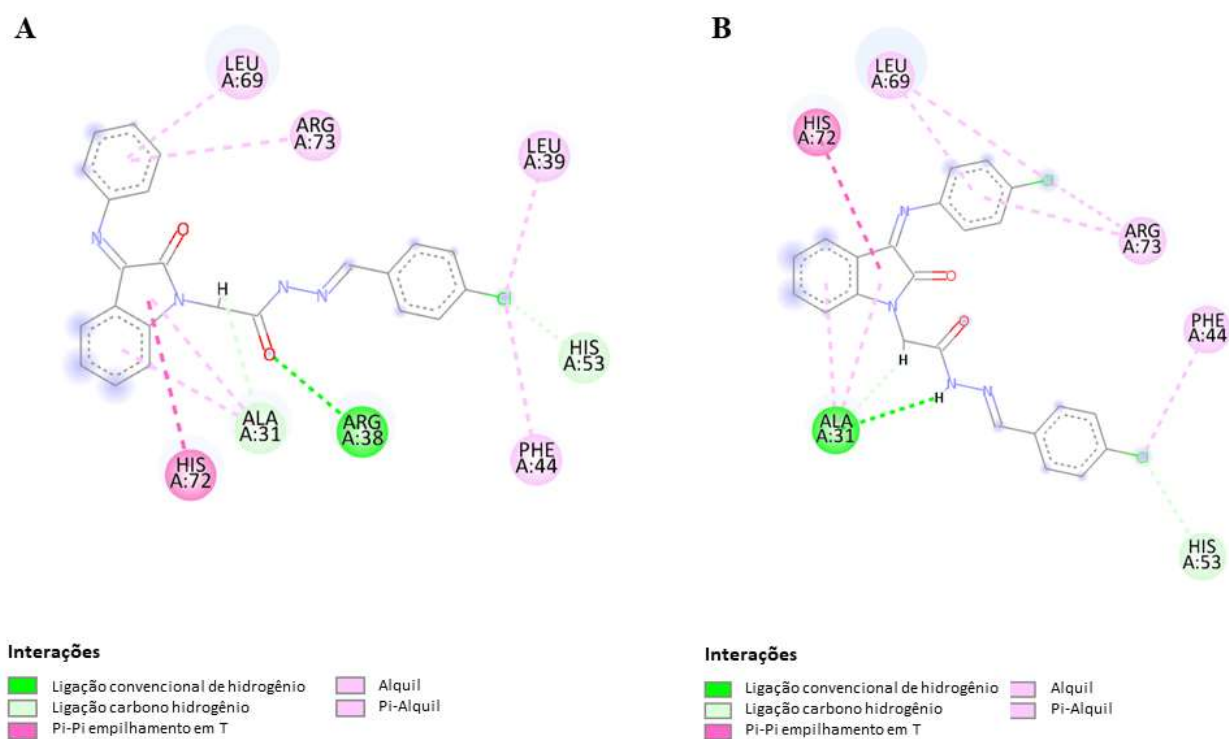
Representação das interações do ligante cocrystalizado a mPGES-1



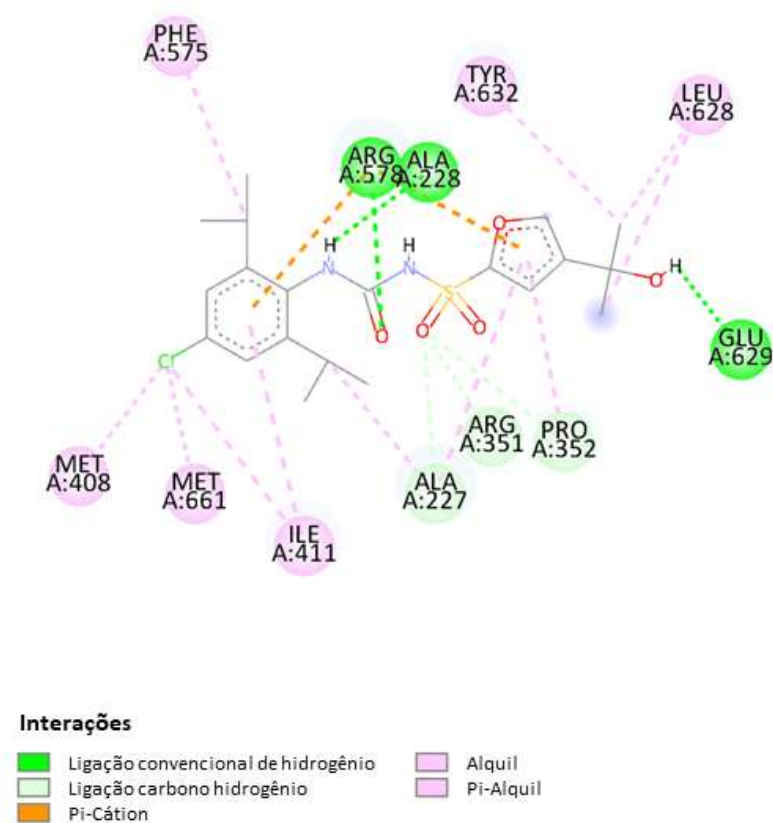
Representação das interações do YV-01 (A) e YV-02 (B) na mPGES-1



Representação das interações do YV-03 (A) e YV-04 (B) na mPGES-1

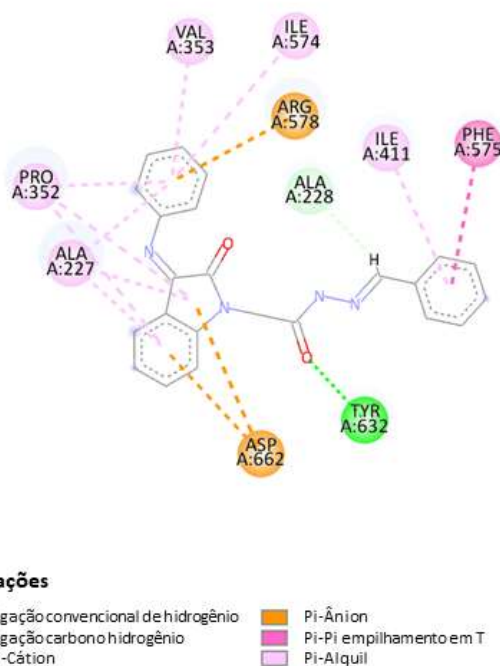


Representação das interações do ligante cocristalizado ao NLRP3

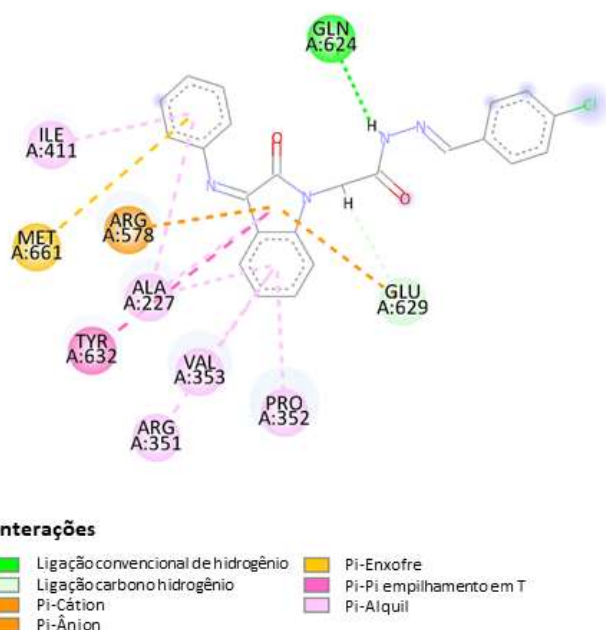


Representação das interações do YV-01 (A), YV-03 (B) e YV-04 (C) no NLRP3

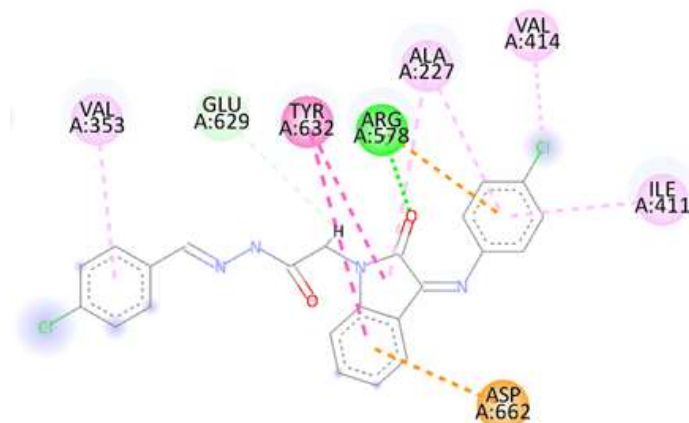
A



B



C

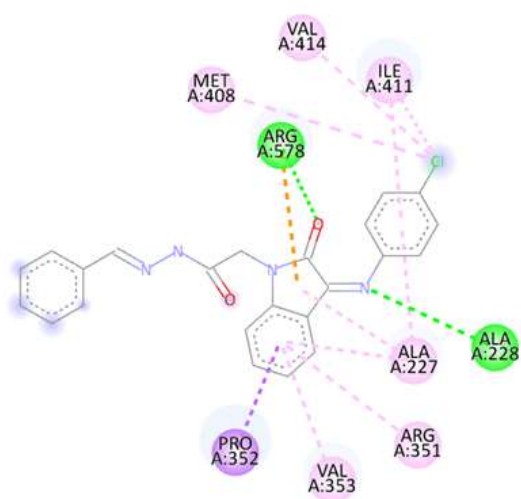


Interações

■ Ligação convencional de hidrogênio	■ Pi-Pi empilhamento
■ Ligação carbono hidrogênio	■ Alquil
■ Pi-Cátion	■ Pi-Alquil
■ Pi-Ânion	

Interações das poses 45 (A), 19 (B) e 72 (C) do YV-02 no NLRP3

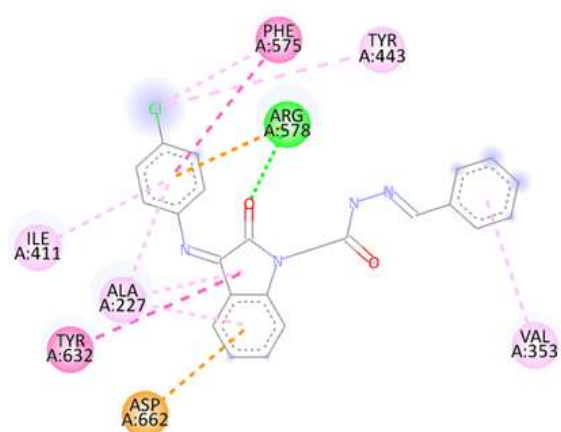
A



Interações

■ Ligação convencional de hidrogênio	■ Alquil
■ Pi-Cátion	■ Pi-Alquil
■ Pi-Sigma	

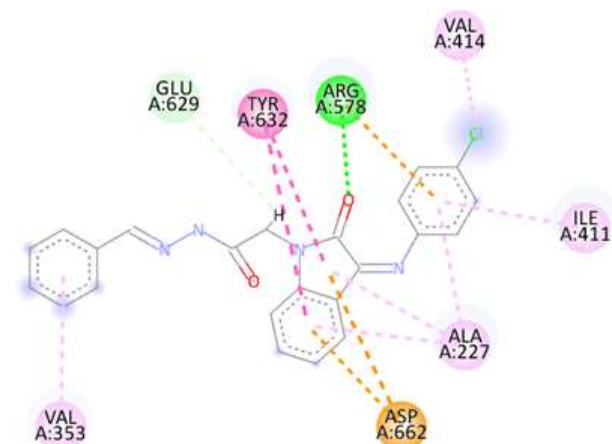
B



Interações

■ Ligação convencional de hidrogênio	■ Pi-Pi empilhamento
■ Pi-Cátion	■ Pi-Alquil
■ Pi-Ânion	

C

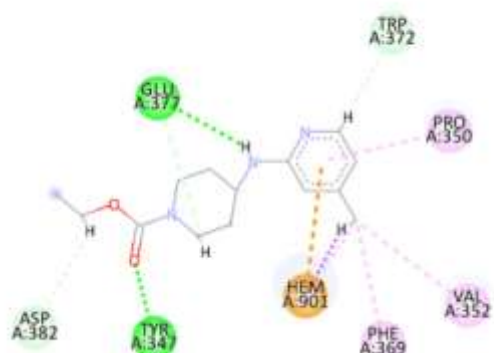


Interações

- | | |
|---|---|
| ■ Ligação convencional de hidrogênio | ■ Pi-Pi empilhamento |
| ■ Ligação carbono hidrogênio | ■ Alquil |
| ■ Pi-Cátion | ■ Pi-Alquil |
| ■ Pi-Ânion | |

Representação das interações do ligante AR-C95791 (A) e YV-03 (B) no iNOS

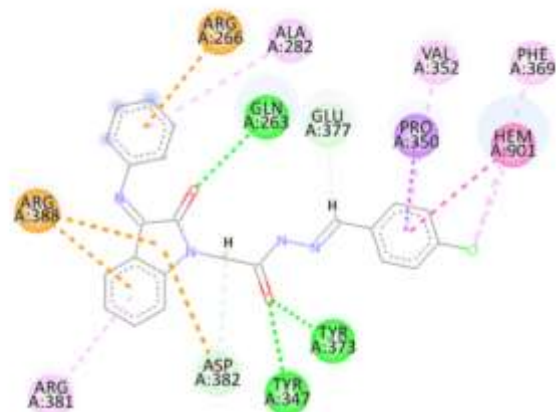
A



Interações

- | | |
|---|---|
| ■ Ligação convencional de hidrogênio | ■ Pi-Pi empilhamento |
| ■ Ligação carbono hidrogênio | ■ Alquil |
| ■ Pi-Cátion | ■ Pi-Alquil |
| ■ Pi-Sigma | |

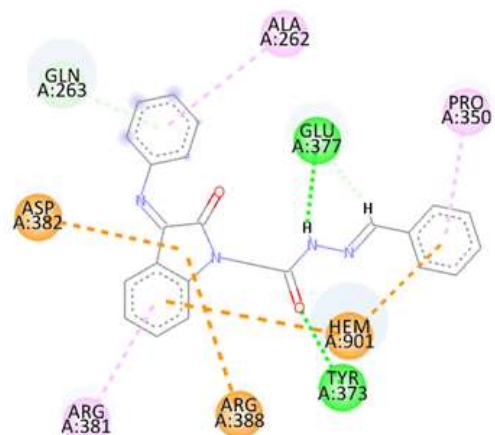
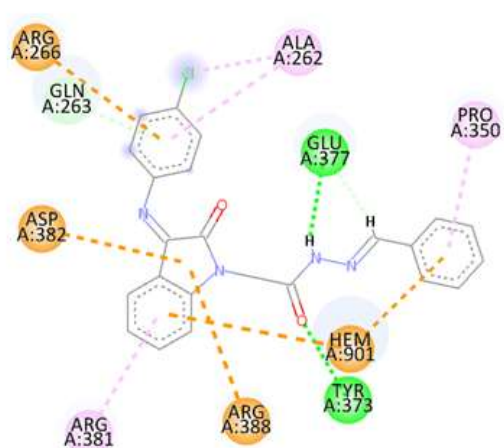
B



Interações

- | | |
|---|--|
| ■ Ligação convencional de hidrogênio | ■ Pi-Sigma |
| ■ Ligação carbono hidrogênio | ■ Pi-Pi empilhamento em T |
| ■ Pi-Cátion | ■ Pi-Alquil |
| ■ Pi-Ânion | |

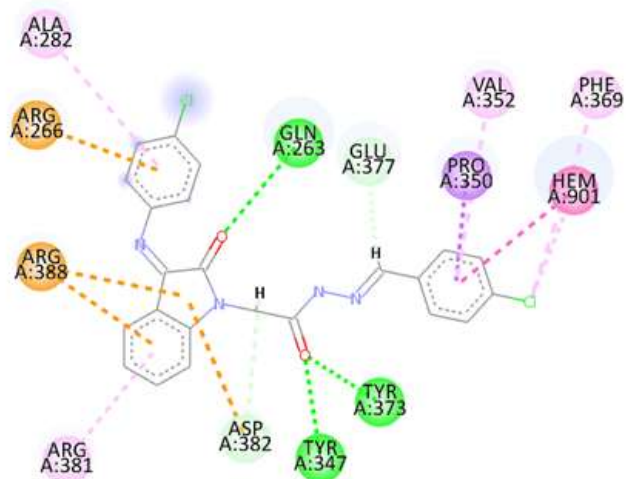
Representação das interações do YV-01 (A), YV-02 (B) e YV-04 (C) no iNOS

A**B****Interações**

- Ligação convencional de hidrogênio
- Ligação carbono hidrogênio
- Pi-Cátion
- Pi-Ânion
- Ligação Pi-Doadora de H
- Pi-Pi empilhamento

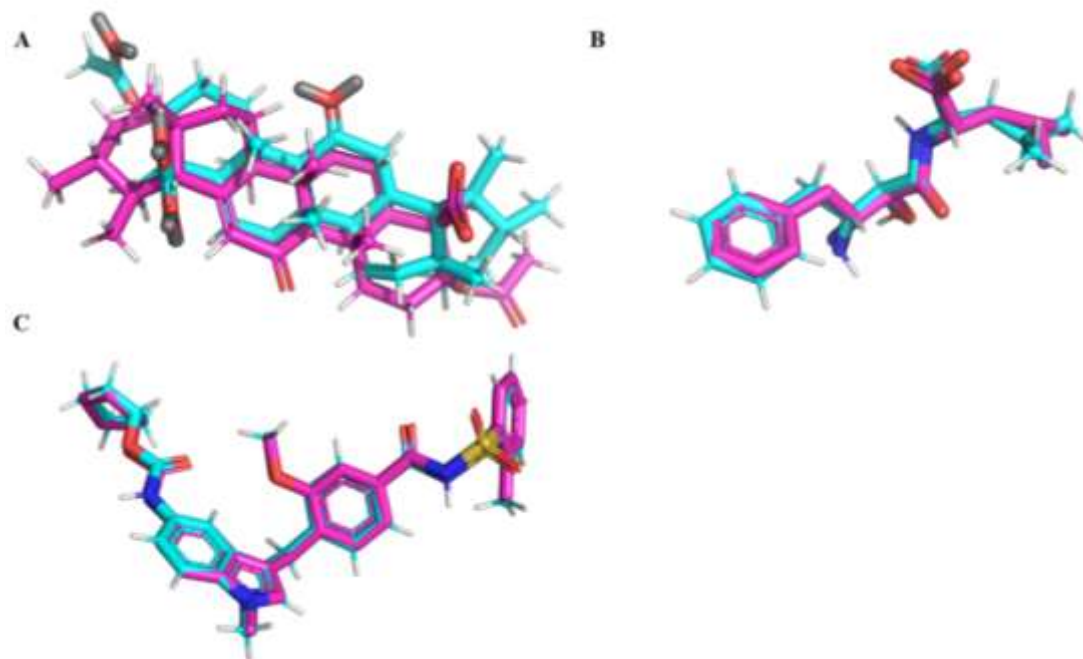
C**Interações**

- Ligação convencional de hidrogênio
- Ligação carbono hidrogênio
- Ligação Pi-Doadora de H
- Pi-Pi empilhamento
- Alquil
- Pi-Alquil

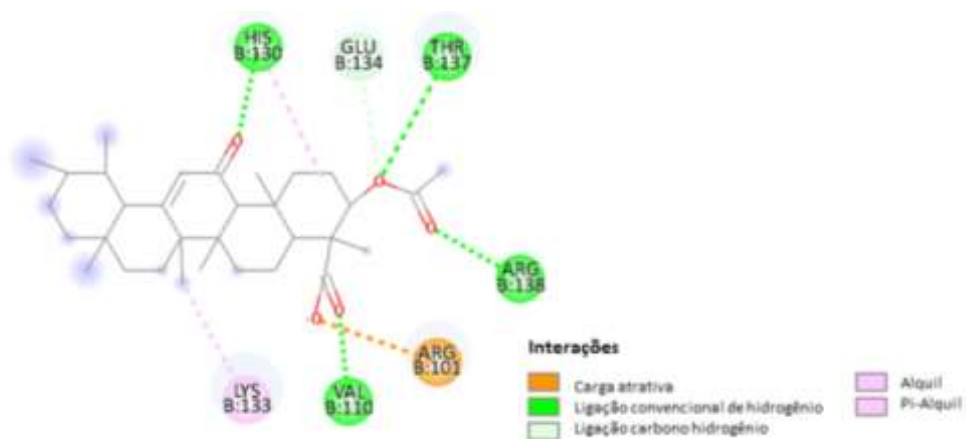
**Interações**

- Ligação convencional de hidrogênio
- Ligação carbono hidrogênio
- Pi-Cátion
- Pi-Ânion
- Pi-Sigma
- Pi-Pi empilhamento em T
- Pi-Alquil

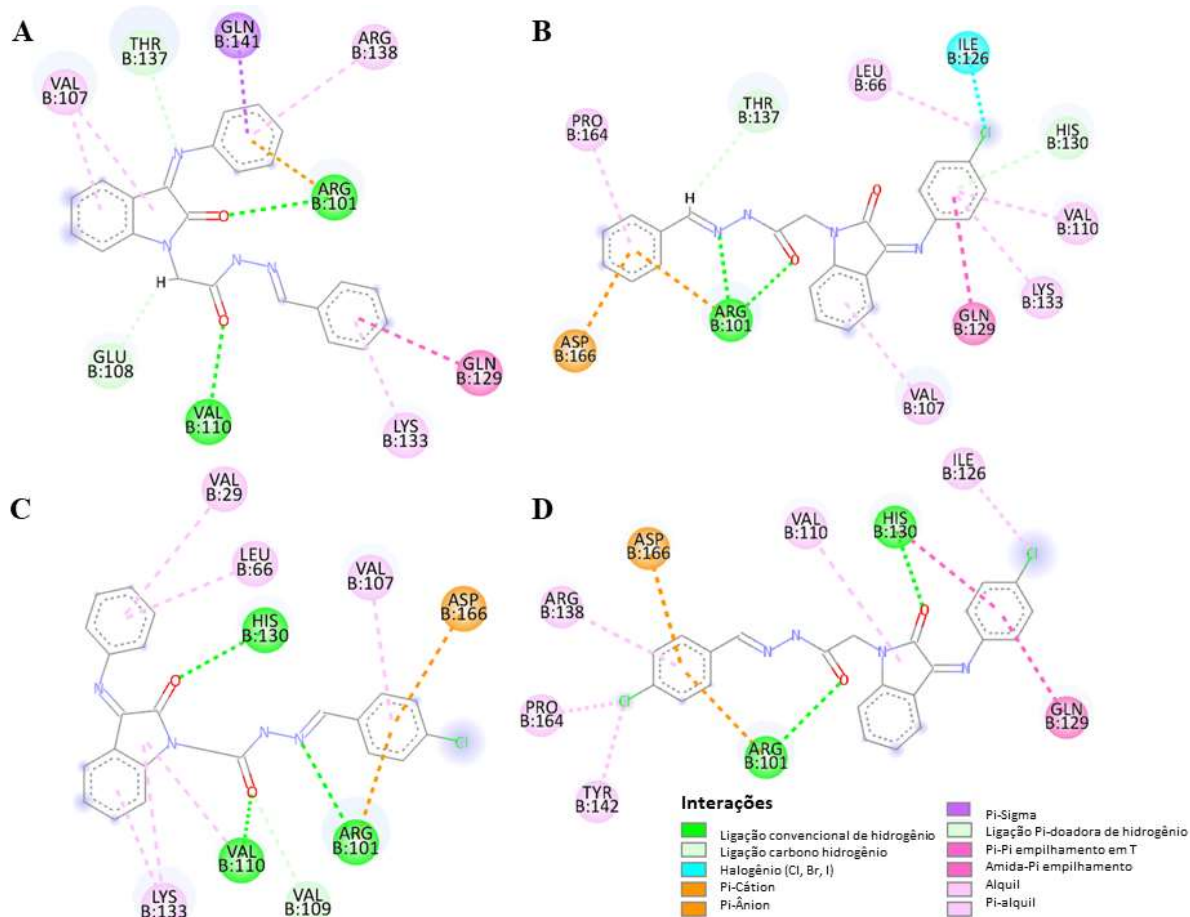
Sobreposição da pose de *redocking* e ligante cocrystalizado: 5-LOX (A), LTA4H (B) e CisLT1 (C)



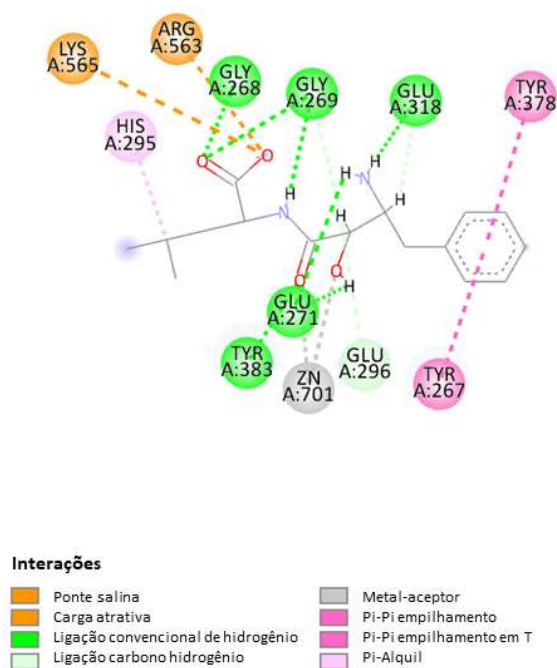
Representação das interações do ligante AKBA cocrystalizado à 5-LOX

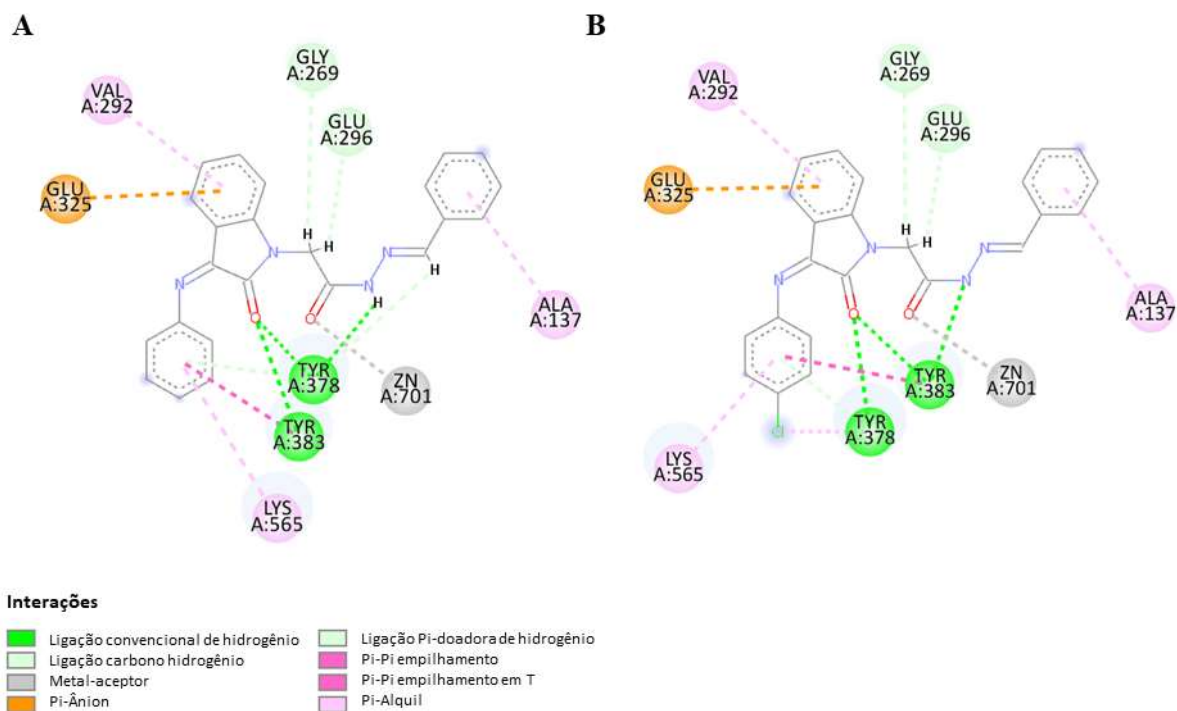
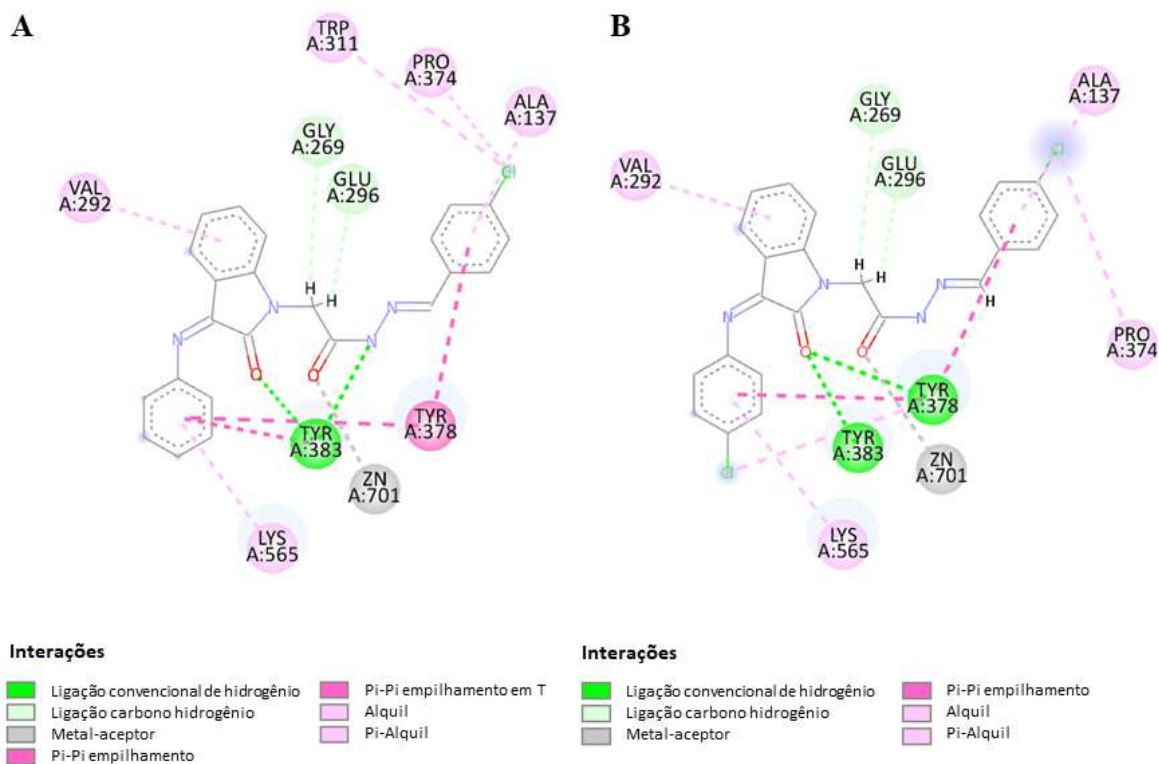


Interações do YV-01 (A), YV-02 (B), YV-03 (C) e YV-04 (D) na 5-LOX

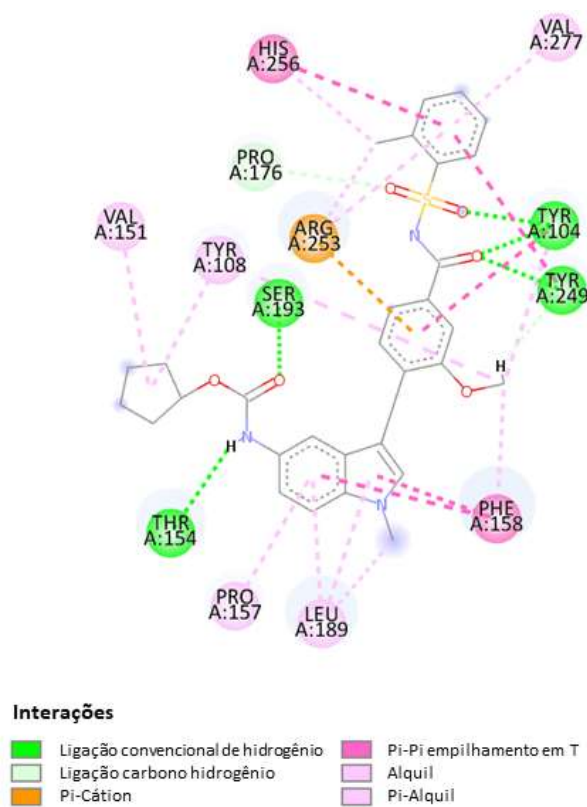


Representação das interações do ligante Bestatina cocrystalizado à LTA₄H

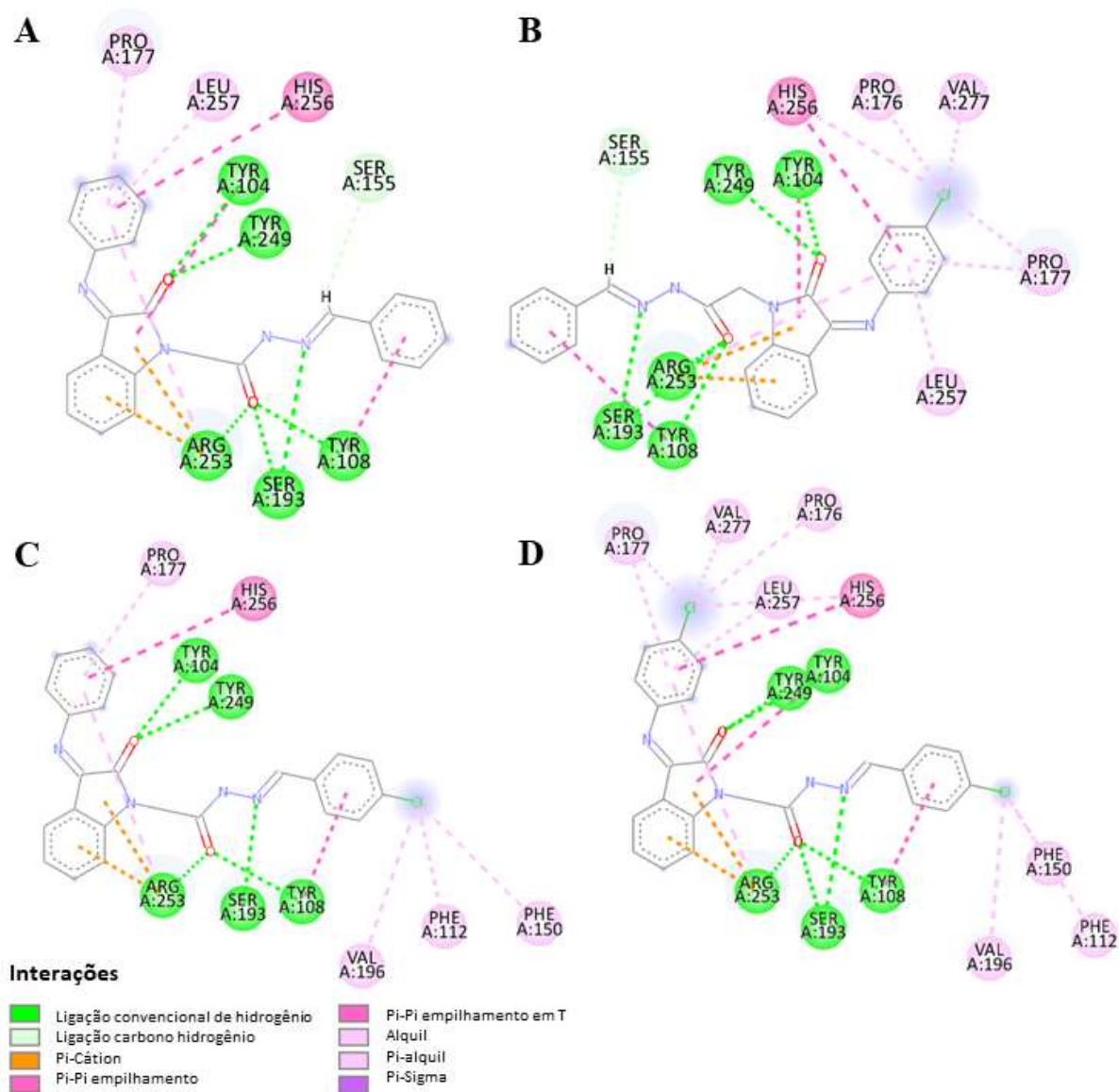


Representação das interações do YV-01 (A) e YV-02 (B) na LTA₄HRepresentação das interações do YV-03 (A) e YV-04 (B) na LTA₄H

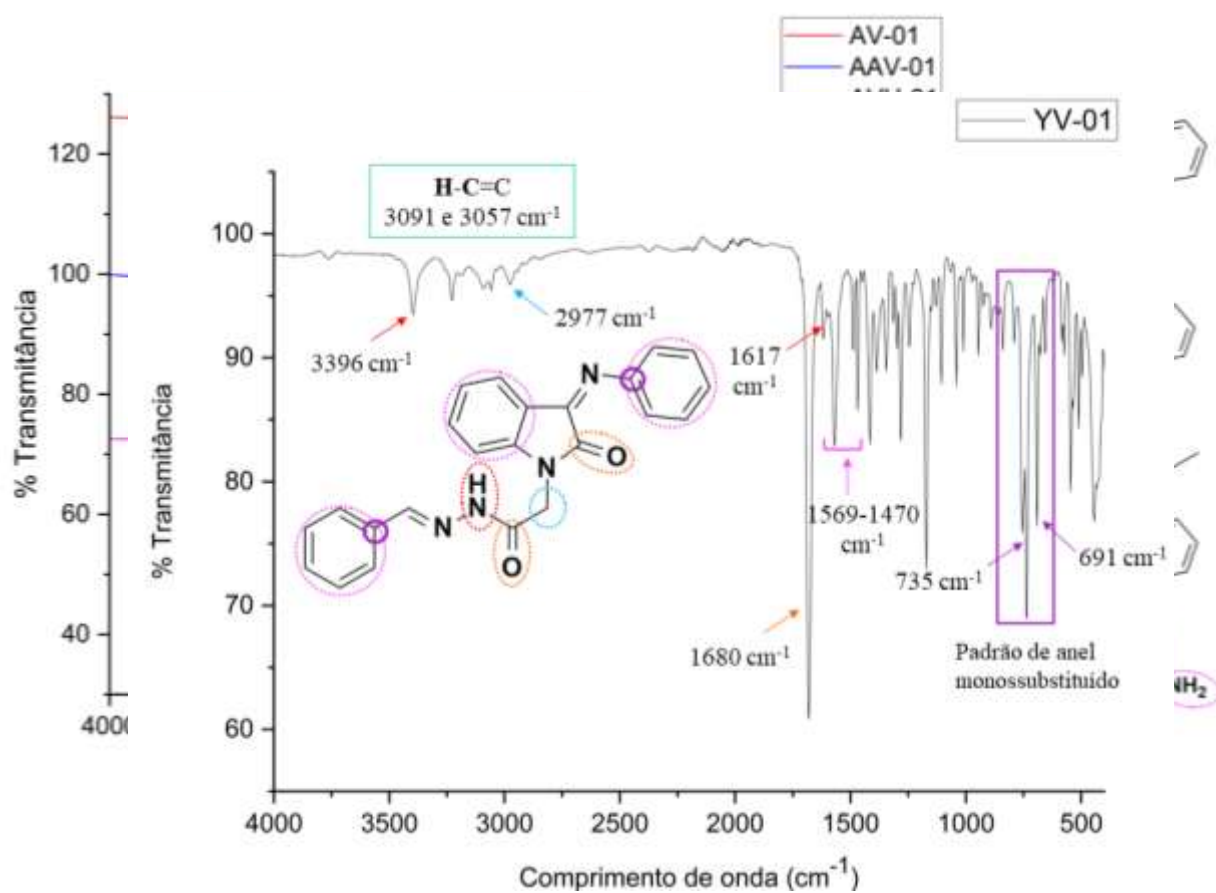
Representação do ligante zafirlucaste cocrystalizado ao cisLT1



Interações do YV-01 (A), YV-02 (B), YV-03 (C) e YV-04 (D) no cisLT1

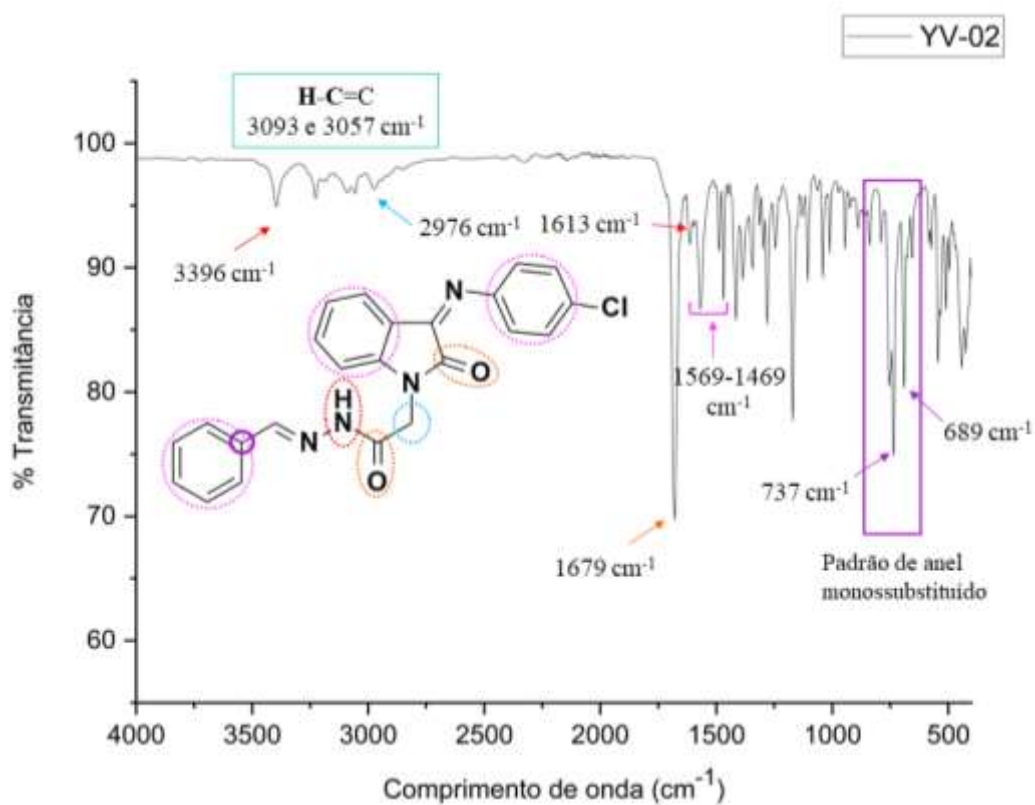


Representação comparativa dos espectros de IV dos compostos intermediários

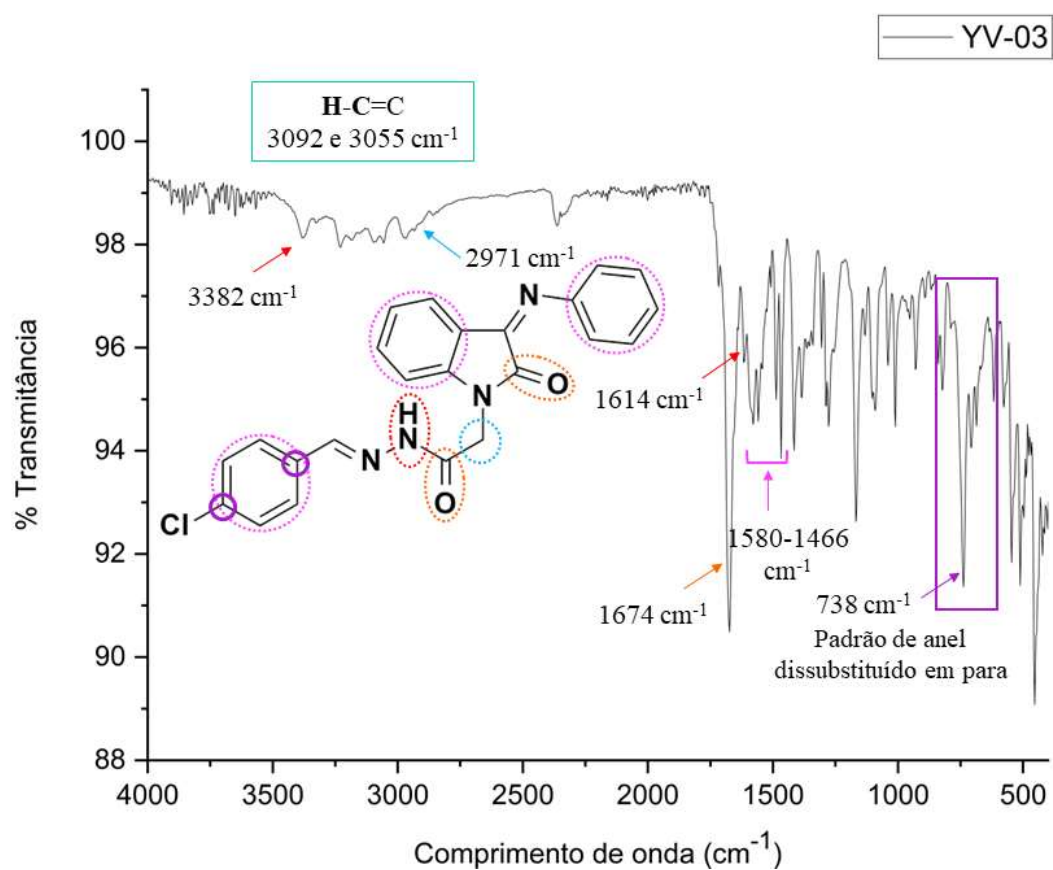


Apêndice 22 – Espectro de IV do composto final YV-01

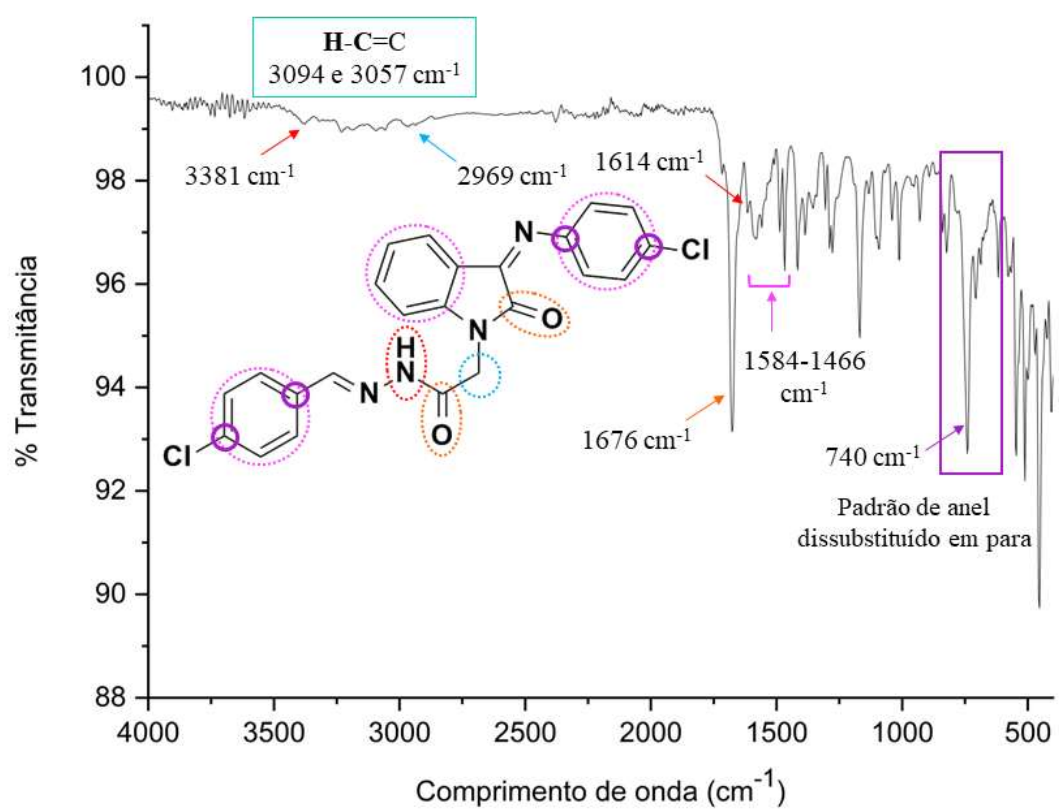
Espectro de IV do composto final YV-02

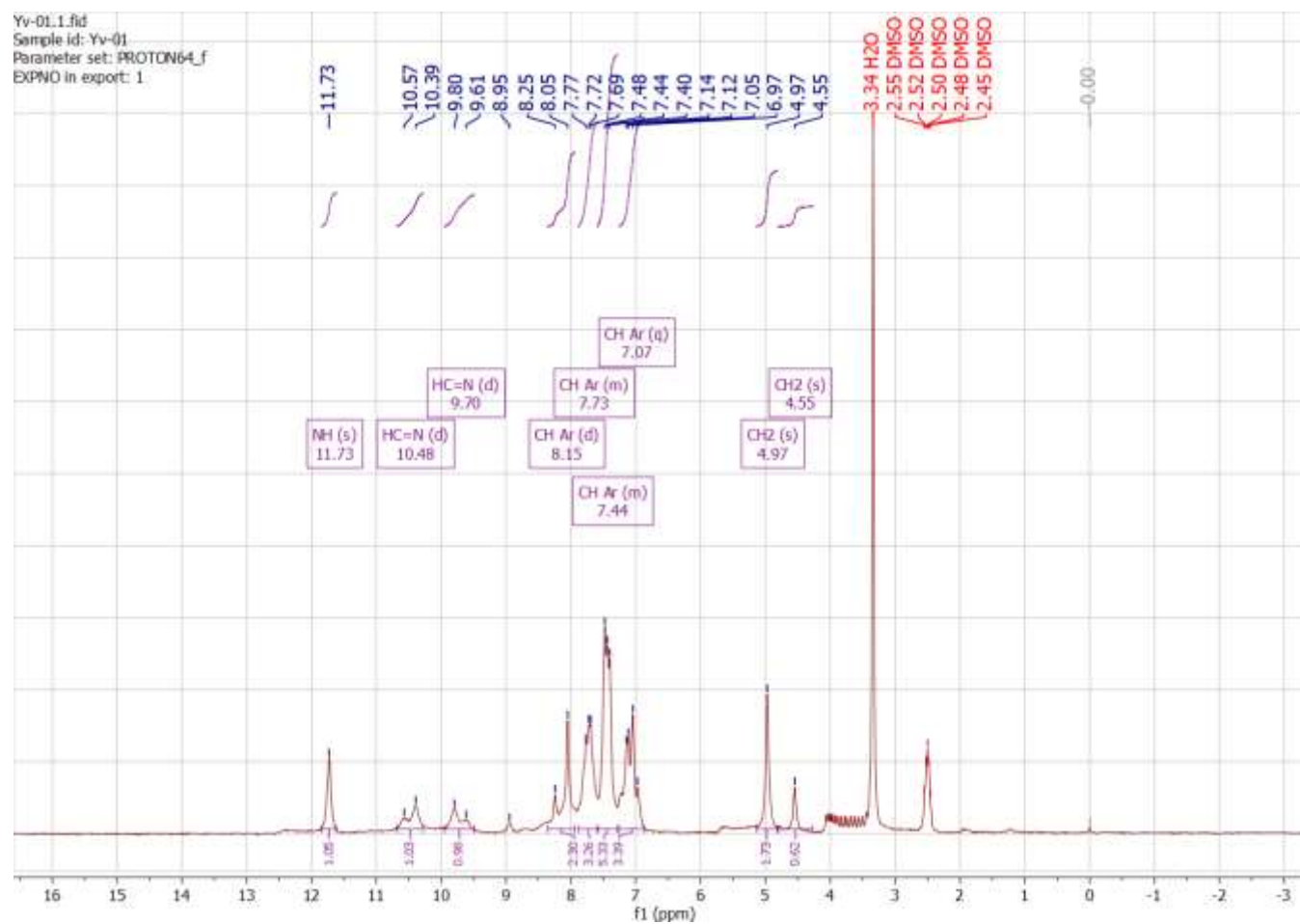


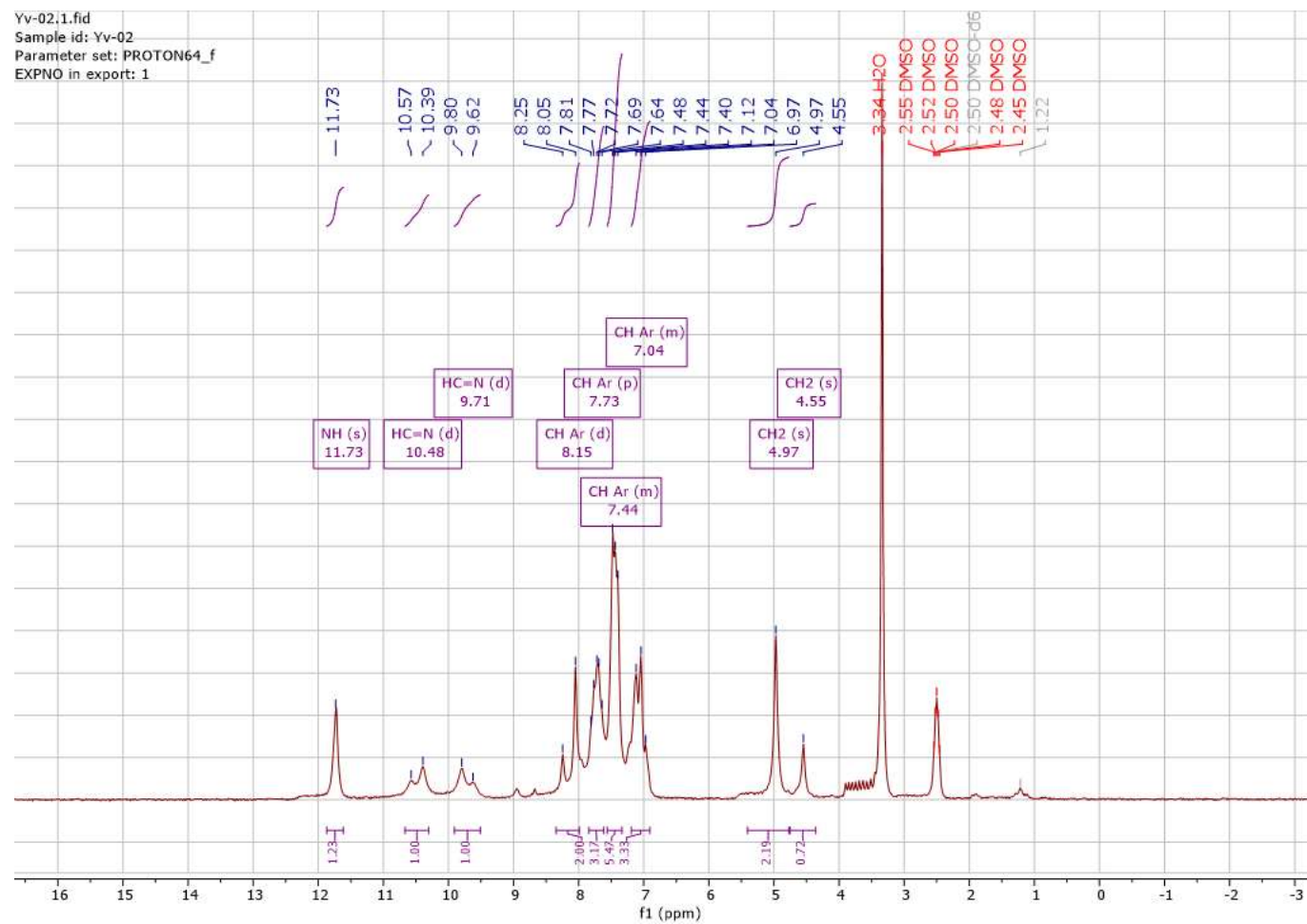
Espectro de IV do composto final YV-03

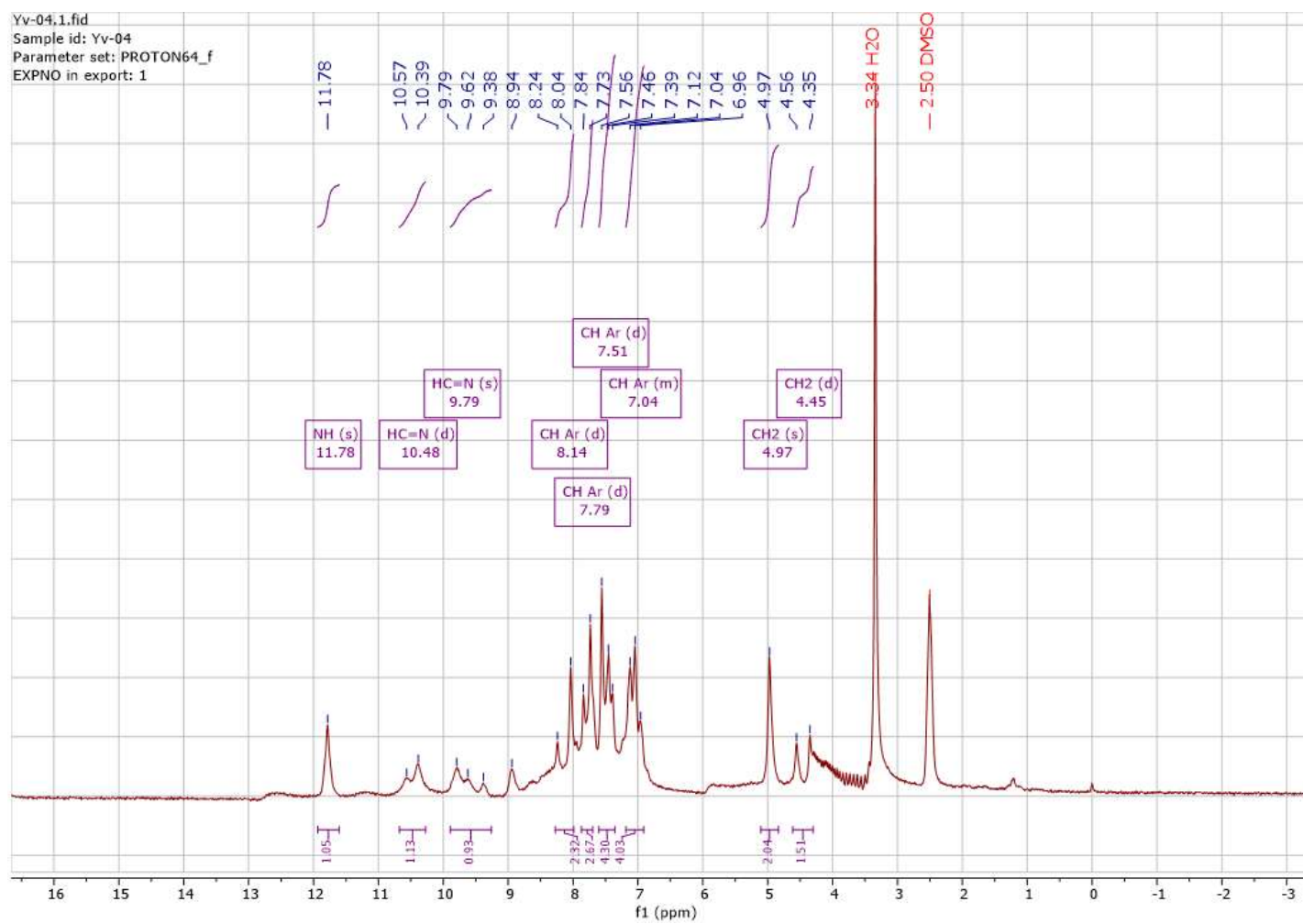


Espectro de IV do composto final YV-04

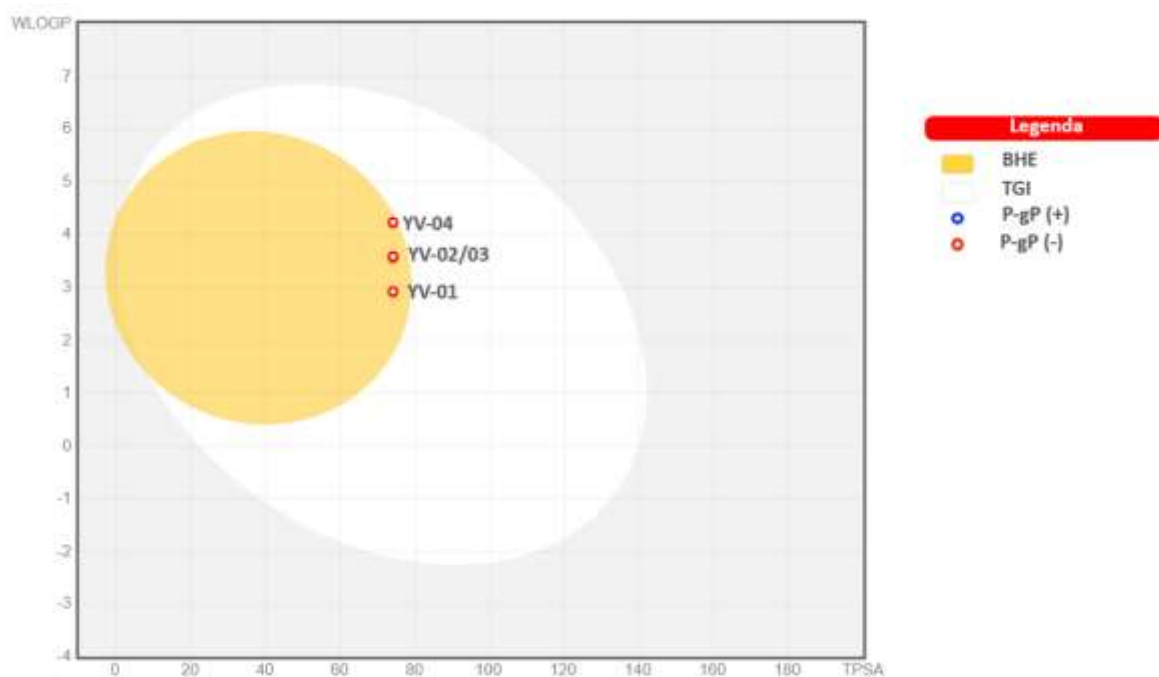


Espectro de RMN de ^1H do composto final YV-01

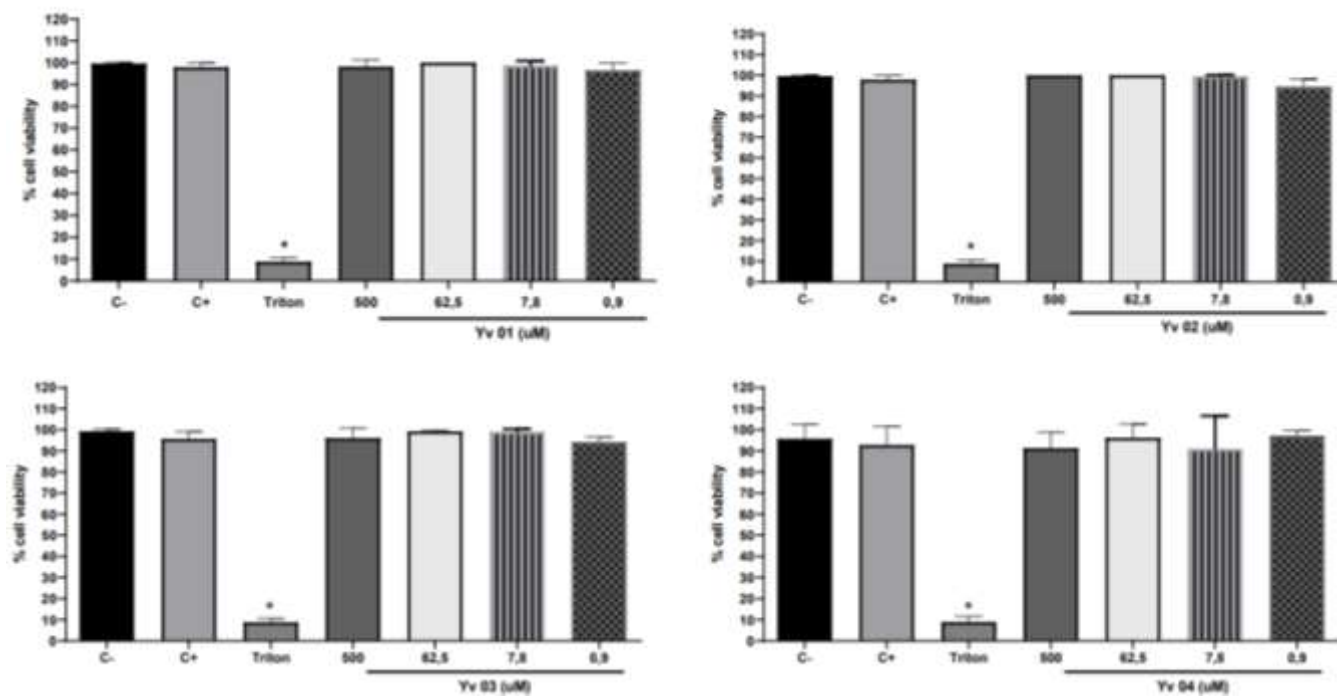
Espectro de RMN de ^1H do composto final YV-02

Espectro de RMN de ^1H do composto final YV-04

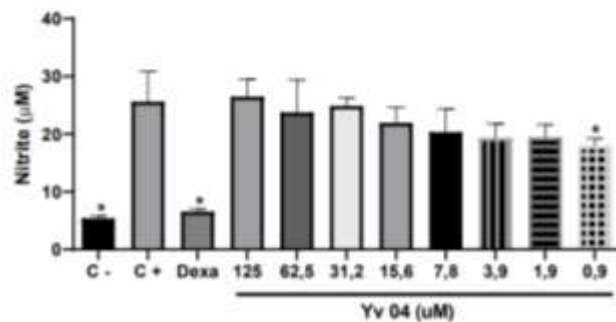
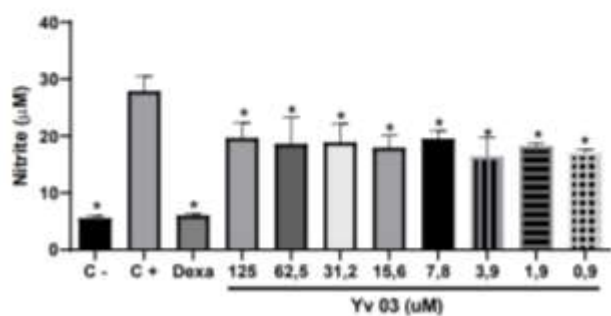
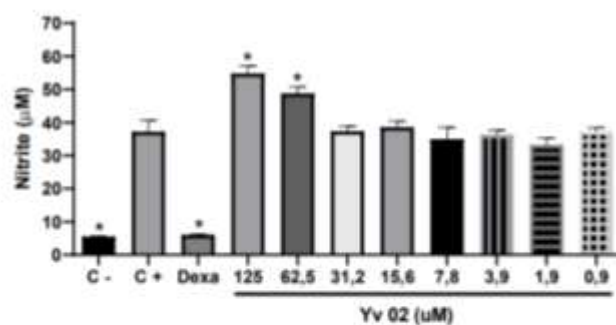
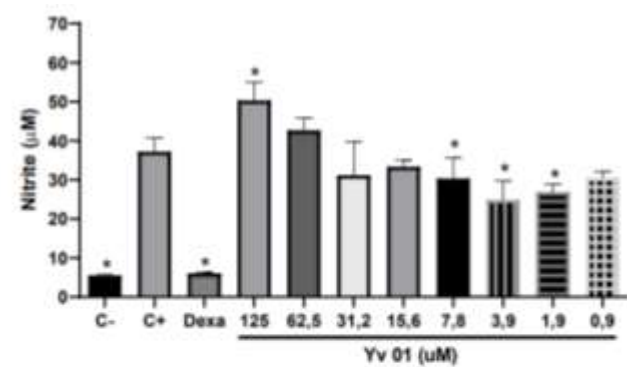
Modelo *boiled-egg* dos derivados híbridos isatínicos hidrazônicos



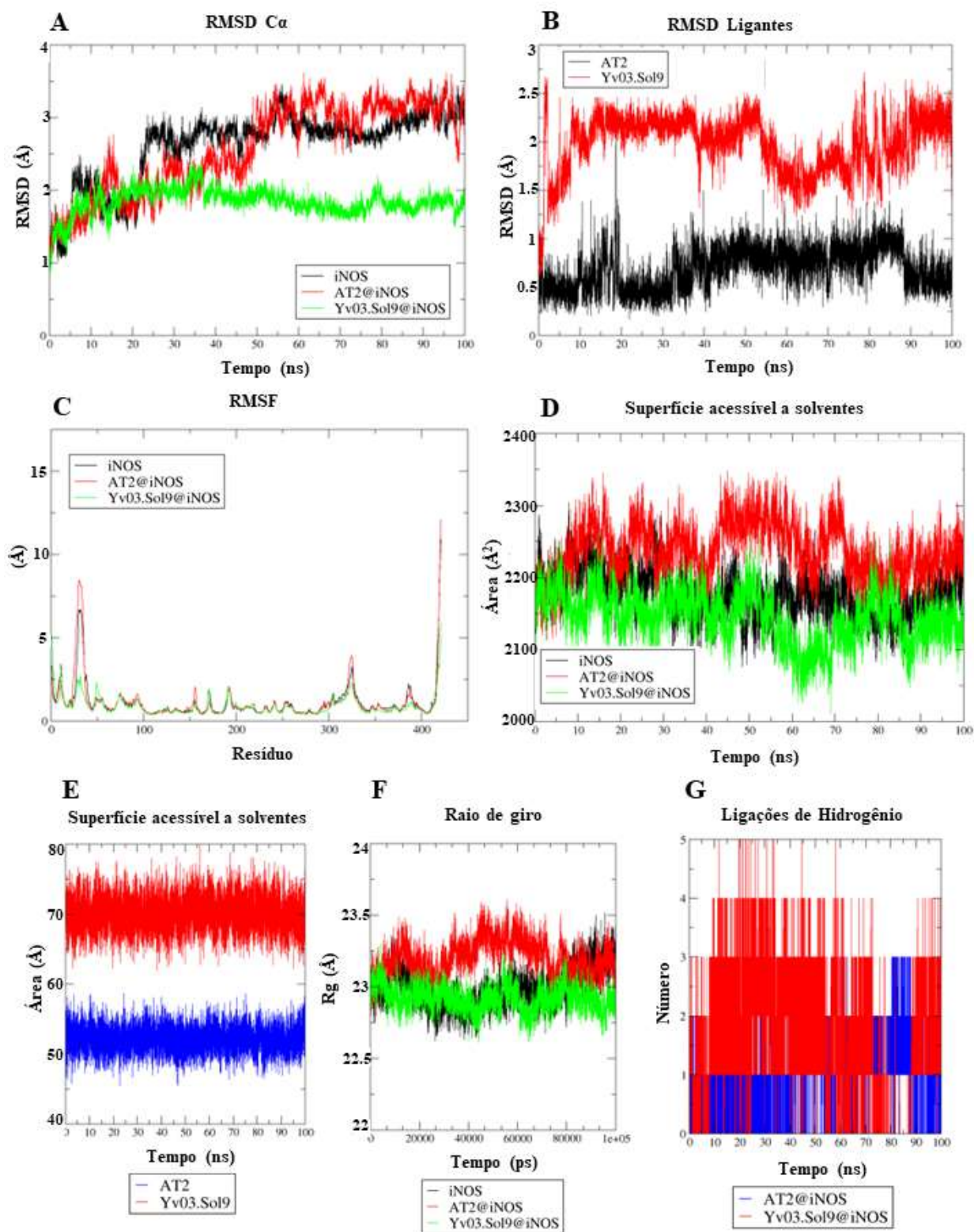
Apêndice 30 – Efeito dos compostos YV01-04 sobre à viabilidade de macrófagos



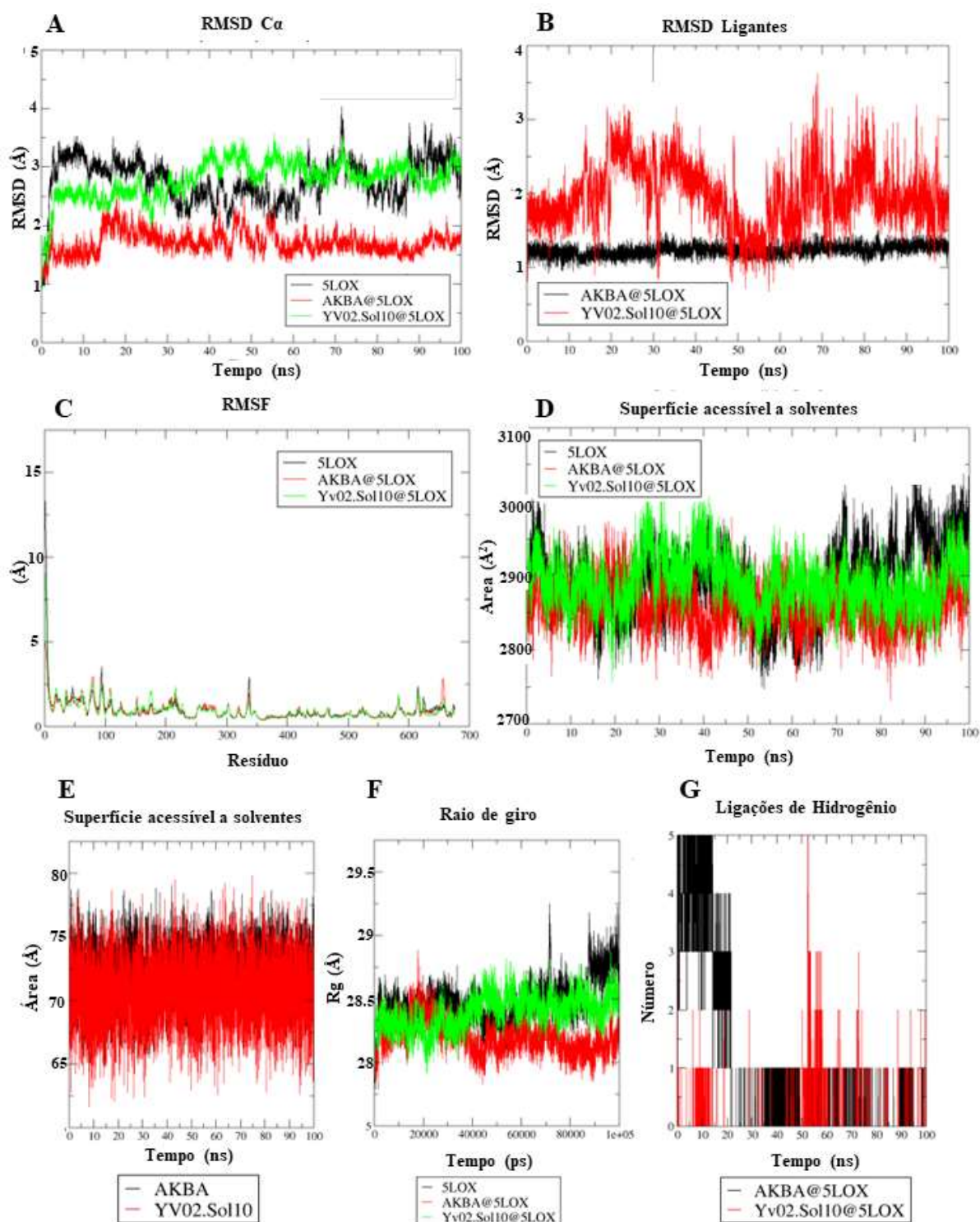
Efeito dos compostos YV01-04 sobre a viabilidade de macrófagos



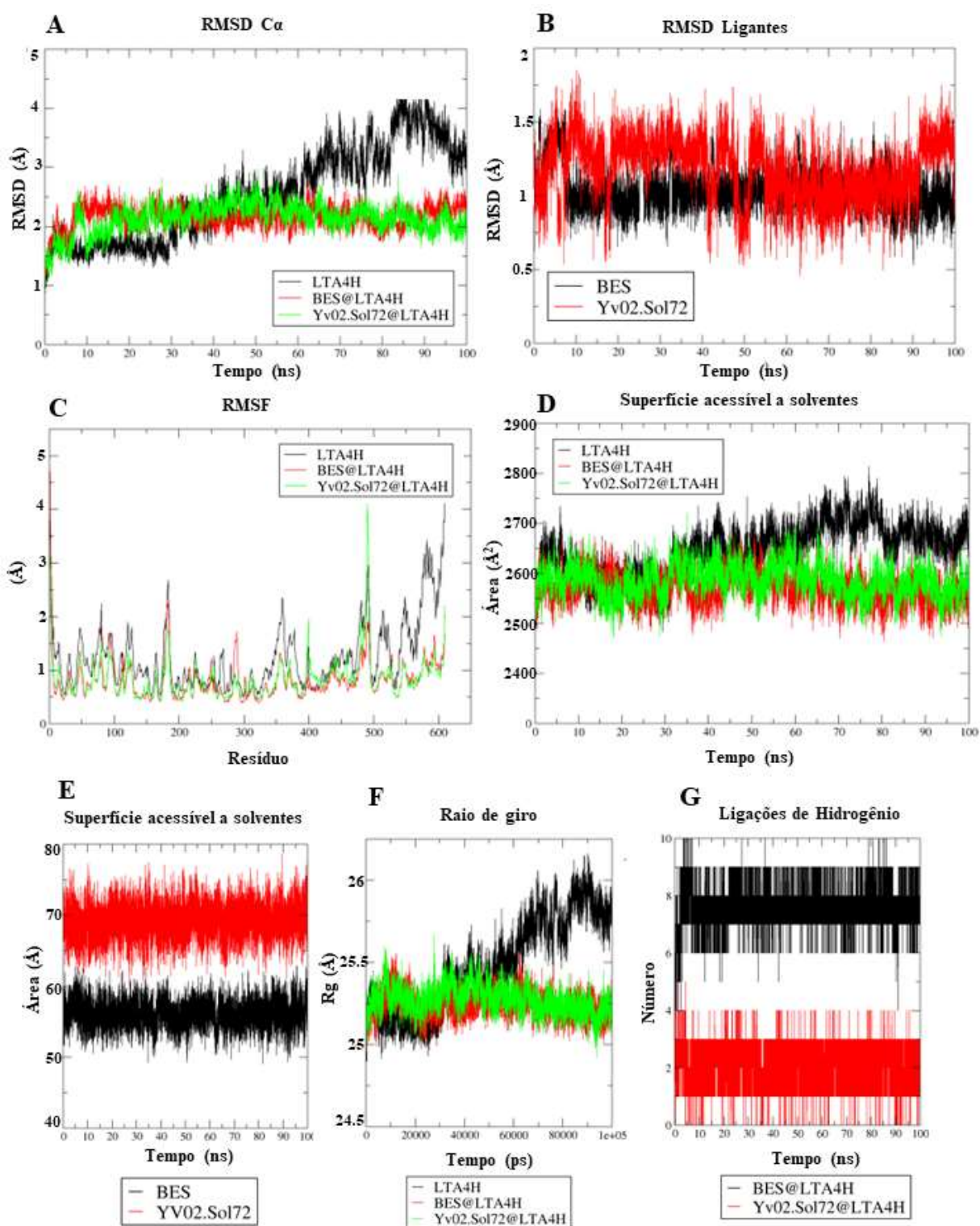
Resultados da simulação de dinâmica molecular no iNOS: A) RMSD de $C\alpha$, B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D/E) SASA, F) R_g e G) Ligações de hidrogênio



Resultados da simulação de dinâmica molecular no 5-LOX: A) RMSD de $C\alpha$, B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D/E) SASA, F) Rg e G) Ligações de hidrogênio



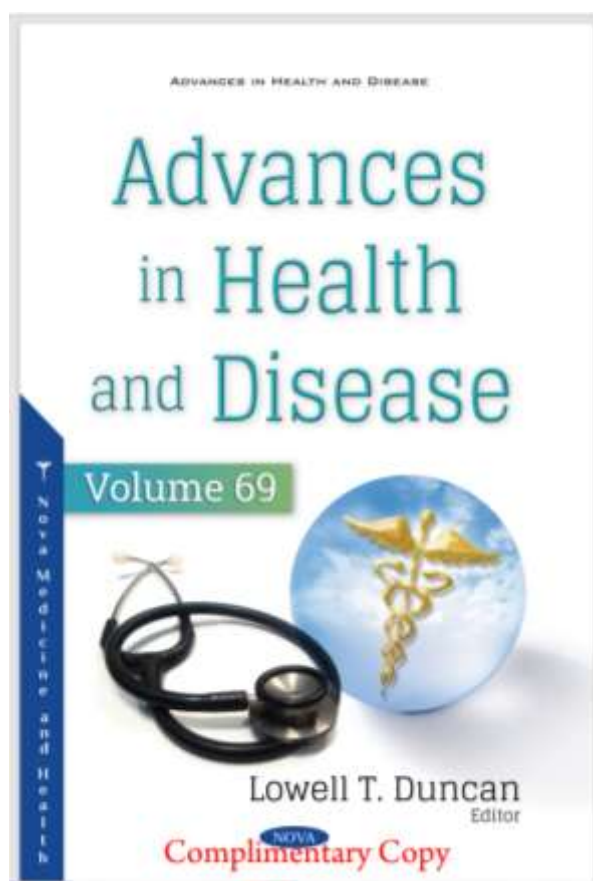
Resultados da simulação de dinâmica molecular no LTA₄H: A) RMSD de C α , B) RMSD dos ligantes, C) RMSF, D/E) SASA, F) Rg e G) Ligações de hidrogênio



ANEXOS A - Capítulo de livro publicado

SILVA, Y. M. S. M.; MEDEIROS, D. C.; SOUZA, M.; MOURA, R. O.; NASCIMENTO, I. J. S. Virtual Screening in a Dataset of FDA-Approved Drugs to Discover NLRP3 Inflammasome Inhibitor Promising against Inflammatory Diseases. In: Lowell T. Duncan. (Org.). Advances in Health and Disease. 69ed. New York: Nova Science Publishers, 2023, v. 69, p. 111-131.

DOI: <https://doi.org/10.52305/WVXQ3308>



Chapter 4

**Virtual Screening in a Dataset
of FDA-Approved Drugs to Discover
NLRP3 Inflammasome Inhibitor
Promising against Inflammatory Diseases**

Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva^{1,2}, MS
Daniel Calazans Medeiros², BHSc
Marianny de Souza², BHSc
Ricardo Olímpio de Moura^{1,2}, PhD
and Igor José dos Santos Nascimento^{1,2,3*}, PhD

¹ Graduate Program in Pharmaceutical Sciences,
Paraná State University, Paraná, Brazil

² Drug Development and Synthesis Laboratory, Pharmacy Department,
Paraná State University, Paraná, Brazil

³ Pharmacy Department,
Cosmos University Center, Maracá, Brazil

Abstract

The innate immune system defends the organism against aggressive agents by activating pattern-recognition receptors (PRRs). In this way, these agents are recognized due to the inflammatory response from the body's homeostasis for pathogen elimination and tissue repair. Inflammasomes are macromolecules related to the host's response to endogenous or exogenous aggressive agents. Thus, inflammation mediated by inflammasomes plays an essential role in the pathogenesis

* Corresponding Author's Email: igor.nascimento@cosmos.edu.br

In: Advances in Health and Disease, Volume 69

Editor: Lowell T. Duncan

ISBN: 979-8-88697-843-8

© 2023 Nova Science Publishers, Inc.

Complimentary Copy

CHAPTER 1

Current Trends in Molecular Modeling to Discover New Anti-inflammatory Drugs Targeting mPGES-1

Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva^{1,2}, Marianny de Souza³, Daniel Calazans Medeiros³, Washley Phyama De Jesus Marinho², Anne Dayse Soares da Silva³, Ricardo Olimpio de Moura^{1,2}, Igor José dos Santos Nascimento^{1,2,3*}

¹ Postgraduate Program of Pharmaceutical Sciences, Pharmacy Department, State University of Paraíba, Campina Grande, Brazil

² Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil

³ Cesmac University Center, Pharmacy Department, Maceió, Brazil.

*Corresponding author: igor.nascimento@cesmac.edu.br or igorjsn@hotmail.com; Tel.: (+55)8299933-5457.

ABSTRACT: Inflammation is a natural response to external stimuli related to the protection of the organism. However, their exaggerated reaction can cause severe damage to the body and is related to several diseases, including allergies, rheumatoid arthritis, diabetes, cancer, and various infections. Furthermore, inflammation is mainly characterized by increased temperature, pain, flushing, and edema due to the production of pro-inflammatory cytokines, such as prostaglandins, and can be controlled using anti-inflammatory drugs. In sense, selective prostaglandin E₂ (PGE₂) inhibition has been targeted and explored for designing new compounds for anti-inflammatory drugs because it can show fewer side effects than non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and corticosteroids. It is a bioactive lipid overproduced during an inflammatory process, produced mainly by COX-1, COX-2, and microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 (mPGES-1). Recently, studies have demonstrated that mPGES-1 inhibition is an excellent strategy for designing anti-inflammatory drugs, which could protect against pain, arthritis, acute inflammation, autoimmune diseases, and different types of cancers. Also, in recent years, Computer-Aided Drug Design (CADD) approaches have been increasingly used to design new inhibitors, decreasing costs and increasing the probability of discovering active substances and constantly applying them to discover mPGES-1 inhibitors. Thus, here, this chapter will approach the latest advances in computational methods to discover new mPGES-1 inhibitors that can be promising against several inflammatory conditions. The focus is on techniques such as molecular docking and dynamics, virtual screenings, pharmacophore modeling, fragment-based drug design, quantitative structure-activity relationship (QSAR), and others explored by researchers worldwide that can lead to the design of a promising drug against this target.

Keywords: mPGES-1; Computer-Aided Drug Design; Anti-inflammatory drugs; Drug discovery; Structure-Based Drug Design; QSAR; Molecular Docking; Molecular

Artigos publicados:

Current Pharmaceutical Design: Fator de impacto= 3.1 (2022)



Current Pharmaceutical Design

Editor-in-Chief »

ISSN (Print): 1381-6128
ISSN (Online): 1873-4286

Back Journal ▾ Subscribe

Mini Review Article

Application of Heterocycles as an Alternative for the Discovery of New Anti-ulcer Compounds: A Mini-Review

Author(s): Lucas Linhares de Lócio*, Agnis Pâmela Simões do Nascimento, Mirelly Barbosa Santos, Joilly Nilce Santana Gomes, Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva, Sonaly Lima Albino, Vanda Lúcia dos Santos and Ricardo Olímpio de Moura

Volume 28, Issue 17, 2022

Published on: 21 June, 2022

Page: [1373 - 1388] Pages: 16

DOI: [10.2174/1381612828666220512095559](https://doi.org/10.2174/1381612828666220512095559)

Price: \$65

Purchase PDF



Current Pharmaceutical Design

Editor-in-Chief »

ISSN (Print): 1381-6128
ISSN (Online): 1873-4286

Back Journal ▾ Subscribe

Review Article

Topoisomerase Enzyme Inhibitors as Potential Drugs Against Cancer: What Makes Them Selective or Dual? – A Review

Author(s): Joilly Nilce Santana Gomes, Mirelly Barbosa Santos, Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva, Sonaly Lima Albino and Ricardo Olímpio de Moura*

Volume 28, Issue 34, 2022

Published on: 26 September, 2022

Page: [2800 - 2824] Pages: 25

DOI: [10.2174/1381612828666220728095519](https://doi.org/10.2174/1381612828666220728095519)

Price: \$65

Purchase PDF

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry: Fator de impacto= 3.8 (2022)



Mini-Reviews in Medicinal Chemistry

Editor-in-Chief »

ISSN (Print): 1389-5575
ISSN (Online): 1875-5607

Back Journal ▾ Subscribe

Review Article

The Power of Molecular Dynamics Simulations and Their Applications to Discover Cysteine Protease Inhibitors

Author(s): Igor José dos Santos Nascimento*, Joilly Nilce Santana Gomes, Jéssika de Oliveira Viana, Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva, Euzébio Guimarães Barbosa and Ricardo Olímpio de Moura

(E-pub Ahead of Print)


Published on: 27 September, 2023

DOI: [10.2174/1389557523666230901152257](https://doi.org/10.2174/1389557523666230901152257)

Price: \$95

Purchase PDF

Pharmaceuticals: Fator de impacto= 4.6 (2022)




Submit to this Journal

Review for this Journal

Propose a Special Issue

Article Menu

Academic Editor

 Mary J. Meegan

Subscribe SciFeed

Recommended Articles












Related Info Links

More by Authors Links

Article Views 478

Open Access Article

Anti-Inflammatory Activity of *N*-(3-(1H-indol-3-yl)benzylidene)-2-cyanoacetylhydrazide Derivative via sGC-NO/Cytokine Pathway

by ^{1,2,3} ^{1,2}, ^{1,2} ^{1,2} ^{1,2} ^{1,3} ⁴ ^{1,3,*} ^{1,2} and ^{1,3,*} 

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil

² Laboratório de Ensaios Farmacológicos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil

³ Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil


⁴ Departamento de Antibióticos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-520, PE, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed.

Pharmaceuticals **2023**, *16*(10), 1415; <https://doi.org/10.3390/ph16101415>

Received: 17 August 2023 / Revised: 13 September 2023 / Accepted: 20 September 2023 / Published: 5 October 2023

(This article belongs to the Special Issue The 20th Anniversary of Pharmaceuticals—Advances in Medicinal Chemistry)

Download  Browse Figures Versions Notes

Artigo aceito para publicação:

Overview of the New Drug Candidates Profile Targeting Topoisomerase Useful Against Colon Cancer

Mirelly Barbosa Santos^{1,3}, Mísaél de Azevedo Teotônio Cavalcanti^{1,3}, Yvni Maria Sales de Medeiros e Silva^{1,3}, Igor José dos Santos Nascimento^{1,3,*}, and Ricardo Olimpio de Moura^{1,3,*}

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil

² Cefmac, University Center, Pharmacy Department, Idemil, Brazil

³ Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil

*Corresponding authors: igorj@hotmial.com or igor.nascimento@cefmac.edu.br; Tel.: (+55)82999335437; and ricardo.olimpio@cefmac.edu.br; Tel.: (+55)82999280751.

Abstract: Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer globally, with high mortality. Metastatic CRC is incurable in most cases, and multiple drug therapy can increase patients' life expectancy by 2 to 3 years. Efforts are being made to understand the relationship between topoisomerase enzymes and colorectal cancer. Some studies have shown that higher expression of these enzymes is correlated to a poor prognosis for this type of cancer. One of the primary drugs used in the treatment of CRC is Irinotecan, which can be used in monotherapy or, more commonly, in therapeutic schemes such as FOLFIRI (Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan) and CAPIRI (Capecitabine and Irinotecan). Like **Capecitabine**, Irinotecan and other compounds have a mechanism of action based on the formation of a ternary complex with topoisomerase I and DNA providing damage to it, therefore leading to cell death. Thus, this review focused on the principal works published in the last ten years that demonstrate a correlation between the inhibition of different isoforms of topoisomerase and *in vitro* cytotoxic activity against CRC by natural products, semisynthetic and synthetic compounds of pyridine, quinoline, acridine, **imidazoles**, indoles, and metal complexes. The results revealed that natural compounds, semisynthetic and synthetic derivatives showed potential *in vitro* cytotoxicity against several colon cancer cell lines, and this activity was often accompanied by the ability to inhibit both isoforms of topoisomerase (I and II), highlighting that these enzymes can be promising targets for the development of new chemotherapy against CRC. Pyridine analogs were considered the most promising for this study, while the evaluation of the real potential of natural products was limited by the lack of information in their work. Moreover, the complexes, although promising, presented as the main limitation the lack of selectivity.