

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**Marcelo Montenegro Rabello**

**Desenvolvimento e automação de metodologias *in silico* para o  
estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação  
terapêutica**

**Recife**

**2016**

**Marcelo Montenegro Rabello**

**Desenvolvimento e automação de metodologias *in silico* para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandes**

**Recife**

**2016**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Rabello, Marcelo Montenegro**

**Desenvolvimento e automação de metodologias *in silico* para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica/ Marcelo Montenegro Rabello– Recife: O Autor, 2016.**

**104 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Marcelo Zaldini Hernandes**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2016.**

**Inclui referências e apêndices**

- 1. Bioinformática 2. Terapêutica 3. Ciclodextrinas**  
**I. Hernandes, Marcelo Zaldini (orientador) II. Título**

**570.285**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-207**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**REITOR**

Professor Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITORA**

Professora Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Professor Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

Professora Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

Professora Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Professora Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Professor Dr. Luiz Alberto Lira Soares

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Rabello, Marcelo Montenegro

Título: Desenvolvimento e automação de metodologias *in silico* para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 29/02/2016

## Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandez

Instituição: Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Instituição: Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Instituição: Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Daniela Nadvorny

Instituição: Departamento de Química Fundamental - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. João Bosco Paraíso da Silva

Instituição: Departamento de Química Fundamental - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

# DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Vicente (*in memoriam*) e Sylvia, que nunca mediram esforços para me proporcionar uma educação de qualidade. Pai, sei que se você estivesse aqui vibraria bastante com essa conquista e faria questão que todos que você conhece soubessem a respeito dela. Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus por me amparar nos momentos difíceis, e me dar força para manter a perseverança na busca por mais uma meta.
- A minha família pelo apoio incondicional, a minha mãe, Sylvia, por todo o amor, carinho, compreensão e encorajamento em toda uma vida. Ao meu pai, Vicente (*in memoriam*), pelo exemplo de como um homem direito deve ser, nunca me esquecerei de você.
- Ao meu avô, Ovídio (*in memoriam*), pelo exemplo de homem, pai e avô. A minha avó, Salésia, por toda doçura que só uma avó pode ter.
- Ao meu tio Luciano, por todos os conselhos, ensinamentos e apoio, eles me guiaram até aqui.
- A Roberta pelo apoio e cumplicidade durante toda a realização desta tese, compreendendo a minha ausência em vários momentos.
- Ao meu orientador, Marcelo, pela orientação competente durante esses nove anos de parceria (iniciação científica, mestrado e doutorado) e, sobretudo pelo seu apoio. Agradeço também pela compreensão nos momentos mais difíceis, estando sempre presente como orientador e amigo.
- Aos meus grandes amigos, que me apoiaram durante o período deste trabalho, trazendo gargalhadas no meio de tanto trabalho.
- Aos amigos do LQTM por todo companheirismo, disponibilidade e incentivo ao longo do desenvolvimento desse projeto.
- Ao professor Pedro Rolim, pela ajuda em trabalhos paralelos durante o período de realização desse projeto de doutorado.
- Ao secretário do PPGIT, Paulo Germano, por sempre achar a melhor solução para todos os problemas burocráticos.
- A FACEPE, pelo apoio financeiro e institucional.

*“Que Deus me dê serenidade  
para aceitar as coisas que não  
posso mudar, coragem para  
mudar as que posso e sabedoria  
para distinguir entre elas.”*

Reinhold Niebuhr

## RESUMO

RABELLO, Marcelo Montenegro. Desenvolvimento e automação de metodologias *in silico* para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica. 2016. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Este trabalho apresenta uma metodologia *in silico* para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica. Um complexo de inclusão é formado por um *host* (hospedeiro), e por um *guest* (hóspede). Neste trabalho, o *host* estudado é a ciclodextrina (e seus derivados) e o *guest*, um ligante (fármaco, em potencial), formando o complexo *host:guest*. O objetivo desse projeto é desenvolver uma plataforma (CycloMolder) capaz de realizar estudos *in silico* dos complexos de inclusão de forma automática e precisa, fazendo uso de uma interface gráfica de usuário. Esse objetivo foi traçado para facilitar os estudos de modelagem molecular para este tipo de sistema químico, com interesse farmacêutico. A plataforma é composta por dois módulos: CycloGen e CycloDock. O primeiro módulo (CycloGen) constrói modelos com mais de uma estrutura para representar um derivado de ciclodextrina. O segundo módulo (CycloDock) realiza o cálculo de *docking* molecular entre as moléculas *host* e *guest*, utilizando o programa Autodock Vina e apresenta os resultados obtidos, incluindo gráficos que mostram a distribuição energética e as interações intermoleculares do complexo. O programa CycloMolder foi testado através de estudos de casos inspirados em problemas farmacêuticos reais. Os testes realizados destacaram a importância da geração de mais de uma configuração para representar significativamente um derivado de ciclodextrina, e também mostrou o potencial analítico do programa, proporcionado pela automação do estudo de modelagem, execução dos cálculos e análise dos resultados. De forma geral, o programa CycloMolder atinge seus objetivos, automatizando e simplificando os estudos *in silico* dos complexos de inclusão, contribuindo desta forma para a inovação terapêutica.

**Palavras-chave:** CycloMolder, complexos de inclusão, ciclodextrina, modelagem molecular, *docking* molecular.

## ABSTRACT

RABELLO, Marcelo Montenegro. Development and automation of *in silico* methodologies for inclusion complexes study used in therapeutic innovation. 2016. Thesis (PhD). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

This work presents an *in silico* methodology for study of inclusion complexes used in therapeutic innovation. An inclusion complex is formed by a host and a guest. In this work, the host is the cyclodextrin and their derivatives and the guest is a potential drug, forming a host:guest complex. The goal of this work is to development a platform (CycloMolder) able to perform *in silico* studies of inclusion complexes in an automated and precise fashion, making use of a graphical user interface. The platform (CycloMolder) consists of two modules: CycloGen and CycloDock. The first module (CycloGen) builds models with more than one chemical structure to represent a cyclodextrin derivative. The second module (CycloDock) performs the molecular docking calculations between the host and guest molecules, using the AutoDock Vina program, and displays the results, including graphs showing the energy distribution and intermolecular interactions present in the host:guest complexes. The CycloMolder program was tested through case studies inspired by real pharmaceutical problems. The tests highlighted the importance of generating more than one chemical structure to better represent a ciclodextrin derivative, also showed the analytical potential of the program, provided by the automation of the modeling study, execution of calculations and analysis of results. Overall, the CycloMolder program achieves its goals by automating and simplifying the *in silico* studies of inclusion complexes, thus contributing to the therapeutic innovation.

**Keywords:** CycloMolder, inclusion Complex, cyclodextrin, molecular modeling, Molecular docking.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Processo de desenvolvimento de um novo medicamento. Figura adaptada (“Biopharmaceutical Research Industry Profile,” 2013). ..... 19
- Figura 2:** Pontos de otimização ( $X_0$  a  $X_4$ ) durante a execução do algoritmo *steepest descent*. ..... 29
- Figura 3:** Ilustração de *docking* molecular. Em azul, o receptor, e em verde, o ligante. Demonstrando a formação do complexo. Imagem gerada com o programa PyMOL (LLC, 2010). ..... 33
- Figura 4:** Estrutura cristalográfica da enzima glicosiltransferase (Ribbon azul) com a  $\beta$ -CD co-cristalizada (esferas cinzas e vermelhas). Código PDB: 3CGT. Imagem gerada com o programa Chimera (PETTERSEN et al., 2004). ..... 34
- Figura 5:** Figura esquemática de uma CD. Em cor bege, os átomos de carbono, e em cor vermelha e branca, os átomos de oxigênio e hidrogênio, respectivamente. Os átomos de carbono C2 e C3 estão ligados às hidroxilas secundárias e o átomo C6 está ligado à hidroxila primária. Imagem gerada com o programa Chimera (PETTERSEN et al., 2004). ..... 44
- Figura 7:** Perfis de solubilidade de fases e representação do equilíbrio CD:Guest. Figura adaptada (DAVIS; BREWSTER, 2004). ..... 46
- Figura 8:** Sistema de classificação biofarmacêutico, que apresenta a caracterização dos fármacos com base nos valores de solubilidade e permeabilidade. .... 48
- Figura 9:** Representação da permeabilidade de fármacos hidrofóbicos encapsulados por CDs. Figura inspirada (CHALLA et al., 2005). ..... 50
- Figura 10:** Geometrias dos complexos de inclusão  $\beta$ -CD:CDF (2:1), formados no estudo de *docking* molecular. Figura extraída do artigo citado no texto (DANDAWATE et al., 2012). ..... 55
- Figura 11:** Quantidade de isômeros de posição em função do número de grupos substituintes na  $\beta$ -CD. É importante ressaltar a escala logarítmica no eixo vertical. .... 59
- Figura 12:** Fluxogramas operacionais dos módulos do CycloMolder e sua arquitetura geral. A) Fluxograma do módulo CycloGen; B) Fluxograma do módulo CycloDock; C) Arquitetura do CycloMolder, com retângulos vermelhos indicando a dependência de código, e retângulos verdes indicando a dependência de *softwares* externos. .... 63
- Figura 13:** Estruturas do host HP- $\beta$ -CD, visão frontal (parte superior) e lateral (parte inferior). A) Uma única estrutura (configuração); B) Superposição de 20 estruturas (configurações); C) Superposição das 100 estruturas (20 configurações, com 5 conformações cada), obtidas após a busca conformacional. .... 64

<b>Figura 14:</b> Telas do CycloGen Wizard. A) Tela para seleção da CD; B) Tela para seleção do grupo substituinte; C) Tela para seleção do método de geração. ....	66
<b>Figura 15:</b> Ilustração do algoritmo para detectar mapas iguais com o derivado HP- $\beta$ -CD. Em A, uma configuração com substituição na posição OH(2) da unidade 1, em C, outra configuração com substituição na posição OH(2) da unidade 3. Em B, as configurações A e C são sobrepostas, onde a configuração C sofreu uma rotação anti-horária de 2 unidades de glicopiranoses. ....	68
<b>Figura 16:</b> Janela principal do módulo CycloGen. ....	74
<b>Figura 18:</b> Telas do CycloDock Wizard. A) Tela para seleção do(s) <i>host(s)</i> ; B) Tela para seleção do(s) <i>guest(s)</i> . ....	76
<b>Figura 19:</b> Representação de uma ligação de hidrogênio, com destaque para o ângulo da ligação. ....	77
<b>Figura 20:</b> Janela principal do módulo CycloDock. ....	79
<b>Figura 21:</b> A) Média das energias de ligação para os complexos de inclusão da $\beta$ -CD, RAM- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD com a molécula itraconazol. B) Médias das análises de interações intermoleculares para os complexos de inclusão da $\beta$ -CD, RAM- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD com a molécula itraconazol. ....	81
<b>Figura 22:</b> Distribuição das médias de energias de ligação para várias configurações do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol. É importante destacar que todos os gráficos apresentados nas figuras 15 e 16 são, de fato, telas do programa CycloMolder, visualizadas pelos usuários durante a análise dos resultados de <i>docking</i> . ....	81
<b>Figura 23:</b> Melhor resultado de <i>docking</i> para o complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol. ....	82
<b>Figura 24:</b> Média das energias de ligação de várias estruturas homólogas do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol, formados por um número crescente de grupos substituintes. ....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Alguns complexos fármaco:CD aprovados e comercializados no mercado mundial. Tabela adaptada (DAVIS; BREWSTER, 2004).....	23
<b>Tabela 2:</b> Limites da quantidade de configurações para o método de geração aleatória simétrica. ....	71

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CD	Ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
CGTase	Glicosiltransferase
CH	Contatos hidrofóbicos
CML	<i>Chemical markup language</i> , linguagem de marcação química
DM	Dinâmica molecular
DM- $\beta$ -CD	Dimetil- $\beta$ -ciclodextrina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucléico
EBIT	Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica
EC	Eficiência de complexação
GA	<i>Genetic algorithm</i> , Algoritmo genético
GAFF	<i>General Amber force field</i> , Campo de força Amber geral
GNU GPL	<i>General Public license</i> , Licença publica geral
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i> , otimização genética para <i>docking</i> de ligantes
GUI	<i>Graphical user interface</i> , Interface gráfica de usuário
HP	2-hidroxiopropil
HP- $\beta$ -CD	(2-hidroxiopropil)- $\beta$ -ciclodextrina
LH	Ligação de hidrogênio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM	Mecânica molecular
MMFF94	<i>Merk molecular force field</i> , Campo de força molecular da Merk
MMFF94s	<i>Merk molecular force field static</i> , Campo de força molecular da Merk estático
MQ	Mecânica quântica
MS	<i>Molar substitution</i> , Substituição molar
OH(2)	Hidroxila na posição 2 da glicopiranoose
OH(3)	Hidroxila na posição 3 da glicopiranoose
OH(6)	Hidroxila na posição 6 da glicopiranoose
PDB	<i>Protein data Bank</i> , banco de dados de proteína

PDBQT	Formato de arquivo <i>Protein Data Bank</i> , <i>Partial Charge (Q)</i> , e <i>Atom Type (T)</i>
PM	<i>Parameterized Model</i> , modelo parametrizado
PMF	Potencial de força média
PPGIT	Programa de pós-graduação em inovação terapêutica
QQ	Química quântica
RM1	Recife <i>Model 1</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i> , desvio do valor quadrático médio
SBE	Sulfobutiléter
SBE- $\beta$ -CD	Sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina
UFF	<i>Universal force field</i> , Campo de força universal
VINA	Autodock Vina
$\alpha$ -CD	$\alpha$ -ciclodextrina
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
$\gamma$ -CD	$\gamma$ -ciclodextrina
$\Delta E$	Energia de interação intermolecular

# SUMÁRIO

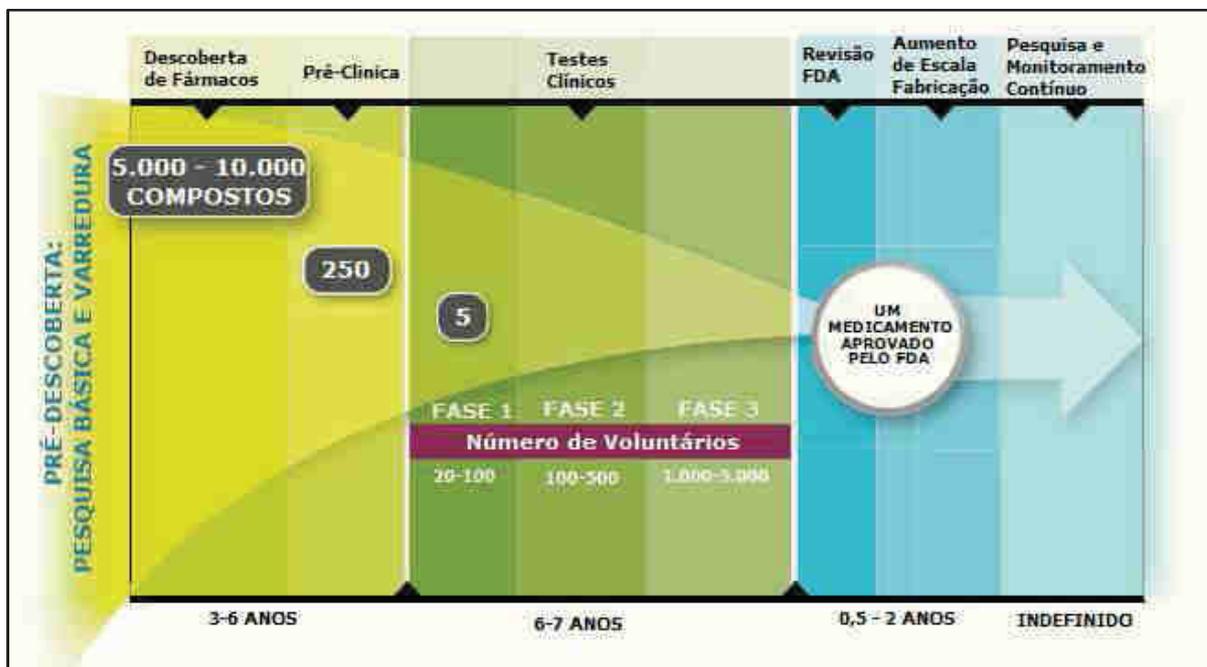
1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	Modelagem Molecular .....	24
2.1.1	Mecânica Molecular.....	25
2.1.1.1	Campos de Força.....	26
2.1.1.1.1	MMFF94.....	26
2.1.1.1.2	GAFF.....	27
2.1.1.1.3	UFF .....	28
2.1.1.2	Métodos de Otimização.....	28
2.1.1.2.1	<i>Steepest Descent</i> .....	29
2.1.1.2.2	Gradientes Conjugados .....	30
2.1.1.3	Dinâmica Molecular.....	30
2.1.1.4	Busca Conformacional .....	31
2.1.2	<i>Docking</i> Molecular .....	32
2.1.2.1	Funções de Pontuação .....	35
2.1.2.2	Programa Autodock Vina .....	37
2.1.3	Biblioteca OpenBabel .....	40
2.1.3.1	Suporte a Formatos de Arquivos.....	40
2.1.3.2	Campos de Força (OpenBabel).....	41
2.1.3.3	Avogadro .....	42
2.2	Complexos de Inclusão .....	43
2.2.1	Ciclodextrinas.....	44
2.2.2	Derivados de Ciclodextrinas .....	51
2.3	Modelagem Molecular envolvendo CDs em complexos de inclusão .....	53
3	OBJETIVOS .....	61
3.1	Geral.....	61
3.2	Específicos .....	61

4	CYCLOMOLDER .....	62
4.1	Implementação .....	62
4.2	CycloGen.....	64
4.2.1	CycloGen <i>Wizard</i> .....	65
4.2.2	Geração de Mapas .....	67
4.2.2.1	Geração Aleatória Assimétrica.....	68
4.2.2.2	Geração Aleatória Simétrica .....	69
4.2.3	Construção das Configurações.....	71
4.2.4	Otimização .....	72
4.2.5	Busca Conformacional.....	73
4.3	CycloDock .....	74
4.3.1	CycloDock Wizard .....	74
4.3.2	Cálculo de <i>docking</i> molecular .....	76
4.3.3	Resultados do CycloDock.....	78
4.3.3.1	Casos de Uso .....	79
5	CONCLUSÕES.....	84
6	PERSPECTIVAS .....	86
7	REFERÊNCIAS .....	87
8	APÊNDICES .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

O termo inovação terapêutica, para profissionais envolvidos com medicamentos, tende a ser usado para definir a introdução de um fármaco (ou outros produtos farmacêuticos) inovador no mercado. Para alcançar esse objetivo uma indústria farmacêutica pode levar entre 10 a 15 anos, e investe em média 1,2 bilhão de dólares (“Biopharmaceutical Research Industry Profile,” 2013). Cada novo fármaco em potencial passa por um processo complexo até chegar ao alcance dos pacientes, como pode ser observado na **Figura 1**.

**Figura 1:** Processo de desenvolvimento de um novo medicamento. Figura adaptada (“Biopharmaceutical Research Industry Profile,” 2013).



O desenvolvimento de um novo fármaco tem início na pré-descoberta, onde profissionais de diversas áreas de pesquisa trabalham em busca do entendimento minucioso de determinada doença. A pesquisa básica fornece subsídios de como tratar a doença e estratégias em potencial de como combater os sintomas. Na próxima etapa, descoberta de fármacos, a busca é por um composto protótipo (*lead compound*). Trata-se de uma molécula promissora, quimicamente ativa, empregada para modular sistemas fisiológicos ou estados patológicos. Essa é uma etapa crítica no processo de desenvolvimento de um novo fármaco.

O termo *in silico* é usado para indicar estudos realizados através do uso de computadores, utilizando modelos teóricos que descrevem interações físicas. O termo segue a tendência dos termos *in vitro* e *in vivo*, fazendo referência ao chip de silício dos computadores, sendo amplamente empregado na literatura de química medicinal para designar a utilização de métodos computacionais para a realização de estudos de modelagem molecular, principalmente voltados para sistemas de interesse biológico ou farmacológico.

A otimização e rápida identificação das moléculas promissoras abrevia o tempo e reduz os custos no desenvolvimento de um novo medicamento. Os métodos *in silico* são importantes para a otimização e rápida identificação, podendo reduzir os custos e o tempo em até 50% (Geldenhuis *et al.*, 2006). Isto ocorre porque muitas vezes o número de moléculas que precisam ser sintetizadas e testadas experimentalmente é drasticamente reduzido por conta da alta preditividade e confiabilidade dos métodos computacionais (*in silico*). Os métodos *in silico* também representam uma grande ajuda aos grupos experimentais, pois muitas vezes dispensam a etapa de alto custo e tempo da síntese de algumas (ou várias) moléculas que não apresentariam atividades biológicas satisfatórias, segundo a predição estatisticamente confiável de modelos *in silico*.

Com a definição do composto protótipo, os pesquisadores começam a se preocupar com o produto final (medicamento). A vetorização da substância ativa em uma forma farmacêutica adequada é uma questão crítica que pode determinar se um fármaco se tornará um novo medicamento de sucesso. A tecnologia farmacêutica é a parte das ciências farmacêuticas que estuda a transformação de substâncias ativas em formas farmacêuticas. Para isso, é necessário ter conhecimento do perfil do composto protótipo, suas propriedades físico-químicas, para planejar e desenvolver formulações adequadas, que garanta exatidão, estabilidade, segurança e um bom perfil farmacocinético para o princípio ativo do medicamento.

A formação de um complexo de inclusão permite incrementar a solubilidade aquosa de fármacos lipofílicos, aprimorando a sua biodisponibilidade e, portanto, seu perfil farmacocinético. Os complexos de inclusão também são capazes de mascarar sabores e odores, reduzir efeitos colaterais além de contribuir para a estabilidade do fármaco, protegendo contra reações indesejadas (Kurkov and Loftsson, 2013; Loftsson and Duchêne, 2007).

Um complexo de inclusão é formado por um *host* (hospedeiro), e por um *guest* (hóspede). Neste projeto de doutorado, o *host* estudado é a ciclodextrina (e seus derivados) e o *guest* é um ligante (ou fármaco, em potencial), formando o complexo *host:guest*.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de glicopirranose, que se apresentam na forma de um tronco de um cone. As orientações individuais das unidades de glicopirranose das CDs mostram que as hidroxilas (parte hidrofílica) estão dispostas nas bordas, enquanto a parte hidrofóbica está no interior (Saenger *et al.*, 1998). Desta forma, as CDs são bem adaptadas para formar complexos de inclusão. Essa propriedade das CDs permite várias aplicações de complexos de inclusão em vários campos de atuação (Boonyarattanakalin, Wolschann and Lawtrakul, 2011), tais como: ciências farmacêuticas (Cavalcanti *et al.*, 2011), catálise (Takahashi, 1998), indústria têxtil (Buschmann *et al.*, 2001), cromatografia (Li and Purdy, 1992), agricultura (Ho *et al.*, 2016) e alimentos (Górnas *et al.*, 2009).

Dessa forma, as CDs apresentam uma estrutura química bem definida, com vários grupos químicos (hidroxilas) para funcionalização com substituintes. Devido a isso, vários tipos de derivados de CDs têm sido preparados com o objetivo de ampliar suas propriedades físico-químicas e sua capacidade de inclusão (Kurkov and Loftsson, 2013; Wenz, 1994). Já é possível encontrar um grande número de fármacos complexados a CDs, ou a um de seus derivados, disponíveis no mercado farmacêutico mundial, onde alguns exemplos podem ser observados na **Tabela 1** (Davis and Brewster, 2004; Kurkov and Loftsson, 2013). A tendência deste número é aumentar, uma vez que existe um grande número de possibilidades de aplicações futuras envolvendo CDs, incluindo

novos usos para os derivados já existentes, bem como a produção de novos derivados (Davis and Brewster, 2004; Kurkov and Loftsson, 2013; Loftsson and Duchêne, 2007).

**Tabela 1:** Alguns complexos fármaco:CD aprovados e comercializados no mercado mundial. (Davis and Brewster, 2004; Kurkov and Loftsson, 2013).

Fármaco	Formulação	Nome de Referência
<b><i>α-ciclodextrina</i></b>		
Alprostadil (PGE <sub>1</sub> )	Intravenosa	Prostvasin, Caverject, Edex
Cefotiam hexetil HCl	Oral	Pansporin T
Limaprost	Oral	Opalmon, Prorenal
<b><i>β-ciclodextrina</i></b>		
Benexate	Oral	Ulgut, Lonmiel
Cetirzina	Comprimido mastigável	Cetizin
Dexametasona	Epidérmica	Glymesason
Iodo	Tópica	Mena-Gargle
Nicotina	Sublingual	Nicorette
Nimesulida	Oral	Nimedex, Mesulid
Nitroglicerina	Sublingual	Nitropen
Omeprazol	Oral	Omebeta
Dinoprostona (PGE <sub>2</sub> )	Sublingual	Prostarmon E
Piroxicam	Oral	Brexin
Ácido tiaprofénico	Oral	Surgamyl
<b><i>2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina</i></b>		
Cisaprida	Retal	Propulsid
Hidrocortisona	Bucal	Dexocort
Indometacina	Colírio	Indocid
Itraconazol	Oral, Intravenosa	Sporanox
Mitomomicina	Intravenosa	Mitozytrex

<b>RAM-<math>\beta</math>-ciclodextrina (<math>\beta</math>-ciclodextrina aleatoriamente metilada)</b>		
17 $\beta$ -Estradiol	Spray Nasal	Aerodiol
Cloranfenicol	Colírio	Clorocil
<b>Sulfobutiléter-<math>\beta</math>-ciclodextrina</b>		
Aripiprazol	Intramuscular	Abilify
Maropitante	Solução parenteral	Cerenia
Voriconazol	Intravenosa	Vfend
Ziprasidona	Intramuscular	Geodon, Zeldox
<b>2-hidroxiopropil-<math>\gamma</math>-ciclodextrina</b>		
Diclofenaco	Colírio	Voltaren
Tc-99 Teboroxima	Intravenosa	CardioTec

Os métodos *in silico* também podem auxiliar no desenvolvimento da formulação adequada. Um bom exemplo é a modelagem molecular de complexos de inclusão (*host:guest*). Existem vários trabalhos na literatura que reportam o uso de diversas abordagens *in silico* com o objetivo de elucidar o mecanismo de interação entre *host* e *guest* no complexo formado, principalmente entre fármacos e ciclodextrinas (Anselmi *et al.*, 2006; Bikádi *et al.*, 2006; Carlotti *et al.*, 2010; Górnas *et al.*, 2009; Leila *et al.*, 2011; Miletic *et al.*, 2013; Seridi and Boufelfel, 2011; Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007).

Neste sentido, o presente trabalho tem o objetivo de contribuir com a definição de estratégias *in silico* que podem ser usadas no estudo de complexos de inclusão, elucidando os mecanismos de interação entre *guests* e CDs (e seus derivados).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Nessa revisão de literatura serão mostradas as bases teóricas para a compreensão deste projeto. As metodologias *in silico* utilizadas para a realização deste estudo dos complexos de inclusão serão descritas abaixo, assim como a fundamentação teórica na área de complexos de inclusão. Por fim, será mostrado o estado da arte nos estudos de modelagem molecular envolvendo os complexos de inclusão.

### 2.1 Modelagem Molecular

A modelagem molecular é uma ferramenta de notável importância na descoberta de fármacos, assim como também no aprimoramento de um fármaco já existente. Este patamar só pôde ser alcançado devido à grande evolução tecnológica na área da computação, que em termos de *hardware*, possibilita a execução de cálculos mais robustos, e de *software*, com programas e metodologias capazes de reproduzir resultados mais próximos dos obtidos experimentalmente (Rodrigues, 2001).

A partir de um sistema biológico (ou farmacológico) de interesse, são definidas as metodologias adequadas para modelar o sistema. Dentre as metodologias disponíveis, a mecânica molecular (MM), a mecânica quântica (MQ), a dinâmica molecular (DM) e o *docking* molecular, estão entre as mais empregadas nos estudos *in silico*.

A mecânica quântica, aplicada a sistemas químicos, é conhecida como química quântica (QQ), e é utilizada para calcular estruturas e propriedades de uma molécula, sendo assim um método de maior precisão, mas também de maior demanda computacional. Estão divididos, essencialmente, em métodos *ab initio* e semi-empíricos. Os métodos *ab initio* resolvem, de forma aproximada, a equação de Schrödinger independente do tempo associada a um Hamiltoniano molecular, enquanto os métodos semi-empíricos têm boa parte dos seus parâmetros ajustados para reproduzir dados experimentais. Essa parametrização aumenta de forma significativa a velocidade dos cálculos (Rodrigues, 2001).

A seguir discutiremos os métodos diretamente ligados a esse trabalho.

### 2.1.1 Mecânica Molecular

Diferentemente da abordagem da mecânica quântica, na mecânica molecular uma molécula é vista como uma coleção de partículas mantidas juntas por forças elásticas. Tais forças são definidas em termos de funções de energia potencial das coordenadas internas da molécula, e compõem o que é chamado de campo de força molecular (Engler, Andose and Schleyer, 1973). Os parâmetros da função de energia podem ser derivados de estudos experimentais e de cálculos de química quântica. Nessa abordagem, os elétrons não são considerados explicitamente, mas uma vez que as posições dos núcleos são conhecidas, é assumido que eles estão implicitamente sendo levados em conta durante os cálculos.

A fórmula básica da função de um campo de força engloba tanto os termos relacionados aos átomos ligados (*bonded* - átomos que estão ligados por ligações covalentes), quanto os termos relacionados aos átomos não-ligados (*nonbonded* - também chamados de não-covalentes, que descrevem as forças de van der Waals e eletrostáticas) (Ponder and Case, 2003). A composição específica dos termos depende das particularidades e especificidades de cada campo de força, mas uma equação genérica representativa para a energia potencial total de um sistema químico, em um campo de força, pode ser escrita como:

$$E_{Total} = E_{bonded} + E_{nonbonded} \quad (1)$$

Onde os componentes das contribuições covalentes e não covalentes podem ser calculados, por exemplo, pelas equações 2 e 3, respectivamente.

$$E_{bonded} = \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsions} k_\phi [\cos(n\phi + \delta) + 1] \quad (2)$$

$$E_{nonbonded} = E_{eletrostat ic} + E_{vanderWaal s} = \sum_{nonbonded\ pair} \left[ \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \quad (3)$$

Os três somatórios da equação 2 são sobre ligações, ângulos e torções (ângulos diedros). Termos adicionais de torções “impróprias” poderiam ser ainda acrescentados para reforçar a planaridade dos anéis aromáticos e outros

sistemas conjugados. Alguns campos de força também incluem termos explícitos para ligações de hidrogênio (Ponder and Case, 2003), por exemplo.

Os termos não ligados, da equação 3, possuem um custo computacional maior por incluírem um número maior de interações por átomos. O somatório dos termos não ligados leva em consideração todos os átomos separados por além de 3 ligações covalentes. O termo eletrostático é calculado pela lei de Coulomb e o termo de van der Waals, calculado por um potencial 6-12 de Lennard-Jones. (Ponder and Case, 2003).

A seguir, vamos descrever um pouco mais os campos de força que foram aplicados nesse projeto de doutorado.

### **2.1.1.1 Campos de Força**

#### **2.1.1.1.1 MMFF94**

O campo de força molecular da Merck (MMFF94) foi feito inicialmente para ser utilizado em estudos de dinâmica molecular, uma versão otimizada para realizar minimização de energia também foi desenvolvida (Halgren, 1996).

O MMFF94 utiliza uma forma funcional original para descrever as interações de van der Waals, onde certos parâmetros de van der Waals são ajustados de forma sistemática aos parâmetros experimentais (Halgren, 1996).

Outra característica está na parametrização fundamental do MMFF94, onde os valores foram definidos a partir de uma grande quantidade de dados computacionais, obtidos a partir de cálculos *ab initio* (aproximadamente 2800 moléculas). Também foi considerada na parametrização uma grande variedade de sistemas químicos não usuais. Com essas características, o MMFF94 fornece parâmetros bem definidos para mais de 20 famílias químicas, e é capaz de tratar um grande número de combinações de grupos funcionais (Halgren, 1996).

Quase todos os parâmetros do MMFF94 foram determinados a partir do conjunto completo dos dados disponíveis, enquanto outros campos de força são ajustados apenas a uma parte dos dados do conjunto disponível, uma abordagem chamada de “grupo funcional” (Halgren, 1996).

Apesar das qualidades, certas limitações são evidentes. Uma, em particular, resulta do fato de que o MMFF94 usa cargas estáticas centradas nos átomos. Como tal, ele negligencia os multipolos de alta ordem e efeitos eletrostáticos que surgem a partir da transferência de carga na molécula. Por causa dessas simplificações, o MMFF94, como uma série de outros campos de força, realiza alguns ajustes. Ele emprega uma melhora na distribuição de carga, simulando o efeito da polarizabilidade, e conseqüentemente amplificando as interações eletrostáticas (para contatos favoráveis) em um meio altamente dielétrico. Infelizmente, essa melhora na distribuição de cargas também amplifica interações eletrostáticas desfavoráveis (Halgren, 1996).

A versão estática do MMFF94 é o MMFF94s. É uma variação feita para ser usada em estudos de minimização de energia, ao invés de dinâmica molecular. Os dois campos de força compartilham a maioria dos parâmetros e produzem resultados idênticos em todos os casos não envolvendo nitrogênios trigonais (tipos: amidas e aminas insaturadas). As geometrias otimizadas com MMFF94, que contém esses átomos de nitrogênio, são deformadas. Por outro lado, o MMFF94s utiliza parâmetros alterados de flexões (fora do plano) para produzir geometrias planas (ou o mais próximo de planas), mimetizando estruturas encontradas através de técnicas de cristalografia (Halgren, 1999).

O campo de força MMFF94 cobre quase todo o espaço químico constituído pelos seguintes átomos: H, C, N, O, S, P, F, Cl, Br, I, Fe, Li, Na, K, Zn, Ca, Cu e Mg (Halgren, 1999).

#### **2.1.1.1.2 GAFF**

Amber é um conjunto de campos de força para proteínas tradicional e amplamente utilizado nos estudos de modelagem molecular. O fato destes campos de força possuírem parâmetros limitados para moléculas orgânicas impediu que fossem amplamente utilizados na concepção de medicamentos e em outros estudos ligante-proteína, interações ligante-DNA e de complexos *host:guest*. Portanto, foi desenvolvido o campo de força Amber geral (GAFF) (Wang *et al.*, 2004), derivado dos campos de força Amber. O GAFF funciona para a maioria das moléculas farmacêuticas, mantendo, na medida do possível,

a compatibilidade como os campos de força Amber para proteínas (Wang *et al.*, 2004).

Os parâmetros do GAFF são baseados em dados computacionais obtidos a partir de cálculos *ab initio*, onde foram utilizadas mais de 4260 moléculas. O campo de força GAFF utiliza 33 tipos de átomos básicos e 22 tipos de átomos especiais para cobrir quase todo o espaço químico constituído pelos seguintes átomos: H, C, N, O, S, P, F, Cl, Br e I. Para os tipos de átomos básicos, todos os parâmetros de comprimento de ligação, ângulos e torções estão disponíveis ou podem ser calculados a partir de regras empíricas. Tipos de átomos especiais foram introduzidos para descrever certos ambientes químicos de forma precisa, como conjugações entre ligações simples e duplas, por exemplo. Diferente dos campos de força convencionais, os parâmetros para todas as combinações de tipos de átomos não estão contidos em uma extensa tabela, mas são determinados a partir da entrada da molécula, baseados na topologia das ligações (determina os tipos de átomos) e na geometria (determina as constantes de força) (Wang *et al.*, 2004).

#### **2.1.1.1.3 UFF**

O Campo de Força Universal (UFF) foi desenvolvido para ser capaz de cobrir todo o espaço químico da tabela periódica. Os parâmetros do campo de força são estimados utilizando regras gerais com base apenas no elemento químico, na hibridação e na sua conectividade (Rappe *et al.*, 1992).

O UFF apresenta uma boa concordância com observações experimentais, quando aplicado na otimização conformacional de compostos onde a carga não aparenta desempenhar um papel importante. Resultados bastante negativos são observados quando o UFF é aplicado a compostos em que as interações eletrostáticas são aparentemente vitais na determinação energética da conformação (Casewit, Colwell and Rappe, 1992).

#### **2.1.1.2 Métodos de Otimização**

A aplicação da mecânica molecular no processo de otimização estrutural fornece uma conformação 3D estável, o que não representa, necessariamente, a estrutura mais estável de todas, para uma determinada molécula. Durante o

processo de minimização de energia, os cálculos são interrompidos quando a molécula atinge a primeira conformação estável (mínimo local). Essa conformação gerada é tipicamente semelhante a conformação inicial, devido a grandes barreiras energéticas existentes entre os mínimos locais de energia. Os métodos *steepest descent* e gradientes conjugados são bastante utilizados na otimização de estrutura.

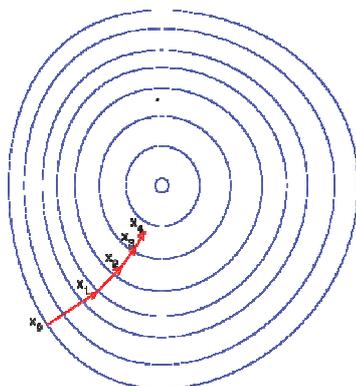
#### 2.1.1.2.1 *Steepest Descent*

*Steepest descent* ("descida mais íngreme") (Holtje and Folkers, 1996; Luenberger and Ye, 2008) é um algoritmo de otimização utilizado para encontrar o mínimo local de uma função. O algoritmo parte de um ponto inicial em busca do mínimo local. A cada iteração o cálculo do próximo ponto é feito conforme a **equação 4**. A partir do ponto atual ( $x_k$ ) é realizada uma busca na direção negativa do gradiente ( $-g_k$ ) até o um ponto mínimo nessa reta ( $x_{k+1}$ ). O tamanho do passo ( $\alpha_k$ ) é um escalar não negativo para possibilitar a minimização da função  $f(x_k - \alpha g_k)$ .

$$x_{k+1} = x_k - \alpha_k g_k \quad (4)$$

O algoritmo tem esse nome porque a direção em que a geometria é otimizada inicialmente é a direção em que o gradiente é maior (mais íngreme) no ponto inicial. Uma vez que o mínimo da função, na primeira direção, é alcançado, a segunda minimização é realizada a partir desse ponto nas direções mais íngremes restantes. Esse processo continua até o mínimo ser alcançado em todas as direções, como pode ser observado na representação ilustrativa da **Figura 2**.

**Figura 2:** Pontos de otimização ( $X_0$  a  $X_4$ ) durante a execução do algoritmo *steepest descent*.



### 2.1.1.2.2 Gradientes Conjugados

No método de gradientes conjugados, a primeira parte da busca acontece na direção do maior gradiente, como no método *steepest descent*. No entanto, para evitar algumas das oscilações para frente e para trás que atrasam a convergência do método *steepest descent*, o método de gradientes conjugados mistura um pouco da direção anterior na próxima busca. Isso permite que o método chegue ao mínimo mais rapidamente (Holtje and Folkers, 1996; Luenberger and Ye, 2008).

Devido à limitação desses métodos em atingir o mínimo global, é necessário fazer a otimização estrutural para várias conformações de uma molécula, e comparar os valores obtidos, dirigindo-se em busca do mínimo global.

### 2.1.1.3 Dinâmica Molecular

Na dinâmica molecular (DM), o comportamento dinâmico dos sistemas moleculares é simulado através da integração numérica das equações do movimento (Rodrigues, 2001). A DM pode ser aplicada para se obter a conformação mais estável de um sistema químico. Durante o processo de DM, os estiramentos das ligações, alterações angulares e torcionais podem ocorrer como se a molécula estivesse sendo aquecida. Isso permite que durante o processo de dinâmica, a molécula seja capaz de assumir conformações instáveis (ou menos estáveis). Desta forma, a molécula de interesse pode ser capaz de transpor as barreiras de energia, aumentando as chances de alcançar o mínimo energético global (Carvalho *et al.*, 2003).

Os átomos e moléculas interagem por um período de tempo pré-determinado explorando o espaço conformacional. As simulações são baseadas nos conceitos físicos da mecânica molecular. A cada passo da simulação a equação de movimento representada pela segunda lei de Newton é resolvida. Cada átomo possui posição, massa e velocidade. A temperatura ( $TT$ ) de um sistema está relacionada com a energia cinética média ( $E_{cin}$ ) de todos os átomos, através da **equação 5**, onde ( $k_b$ ) é a constante de Boltzmann, ( $Ndf$ ) é o número de graus de liberdade (3 vezes o número de átomos), ( $m_i$ ) massa do átomo  $i$  e ( $v_i$ ) a velocidade do átomo  $i$  (Holtje and Folkers, 1996).

$$\sum m_i \times v_i^2 = 0.5 \times Ndf \times k_b \times T = E_{cin} \quad (5)$$

O conceito de temperatura é fundamental na simulação de dinâmica molecular. Normalmente as simulações ocorrem a uma temperatura entre 300 K e 400 K. A temperatura precisa ser suficientemente alta para permitir a transposição das barreiras de energia, porém não podendo ser tão alta a ponto de assumir conformações distorcidas de alta energia. A aplicação de temperaturas mais elevadas aumenta a amostragem conformacional, aumentando também a chance de alcançar a conformação com energia mínima global (Holtje and Folkers, 1996).

#### 2.1.1.4 Busca Conformacional

Outro ponto que pode ser abordado pela mecânica molecular é a investigação dos graus de liberdade ativos de um sistema molecular, através do que é frequentemente denominado Busca ou Análise Conformacional. O que estes métodos fazem, essencialmente, é uma busca no espaço de energia potencial, procurando por conformações que podem possuir uma menor energia potencial ou uma maior variabilidade dos graus de liberdade, dependendo da finalidade da busca (O'Boyle, Vandermeersch, *et al.*, 2011).

Para realizar a busca conformacional, são utilizados campos de força ou funções de pontuação baseadas em campos de força. Essas funções também podem se basear em estudos experimentais ou em cálculos altamente, precisos, de mecânica quântica.

Diversos métodos podem ser utilizados para realizar a busca por conformações, sendo um deles o algoritmo genético (GA). É um algoritmo bastante robusto, amplamente utilizado em problemas de otimização e busca. O GA mimetiza o processo conhecido como evolucionário, manipulando uma coleção de dados estruturais chamados de cromossomos. Cada um deles codifica uma possível conformação, ou seja, nele estão contidas as informações de uma possível solução (conformação) para a otimização. A estes cromossomos, pode ser atribuída uma pontuação (*score*), baseada na estabilidade da conformação (Jones, Willett and Glen, 1995).

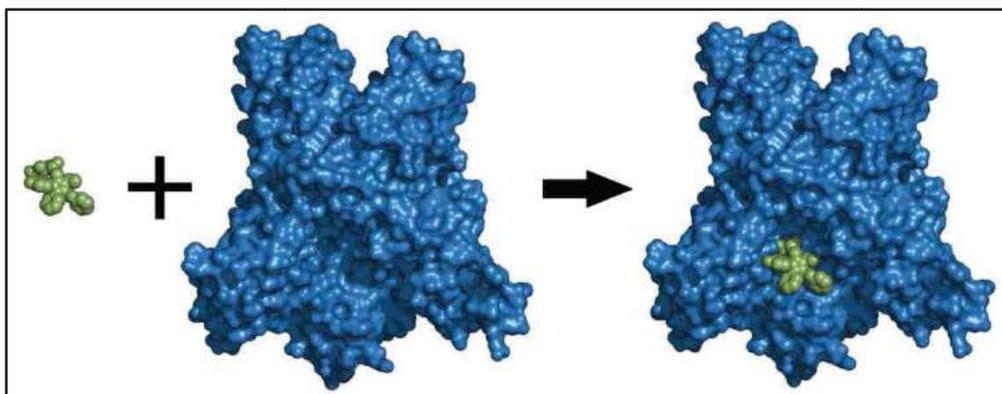
Iniciado por uma população de cromossomos gerados randomicamente, o GA aplica repetidamente operadores genéticos (ex: *crossover* e mutação), resultando em cromossomos que irão substituir os membros menos adaptados da população. O *crossover* combina cromossomos, enquanto que a mutação introduz perturbações randômicas. Ambos necessitam de cromossomos “pais”, selecionados de forma randômica dentre a população existente, com um viés para os mais aptos (ou otimizados), dessa forma introduzindo uma pressão evolutiva no algoritmo (Jones, Willett and Glen, 1995).

### 2.1.2 *Docking* Molecular

O termo *docking* é proveniente da língua inglesa e significa atracar, ancorar ou acoplar, fazendo alusão ao fato das moléculas estudadas (ligantes) serem “ancoradas” tipicamente nas imediações do sítio ativo do alvo biológico ou farmacológico, assim como um barco atraca a um cais de porto.

O *docking* determina se há interações favoráveis entre estas duas moléculas (ligante e receptor), no intuito de elucidar as razões moleculares responsáveis pela potência farmacológica destes ligantes ou fármacos em potencial. O procedimento de *docking* busca pela orientação que maximiza essas interações intermoleculares, por exemplo, minimizando a energia de interação do sistema. Assim, o ligante e a proteína formam um complexo por complementaridade estrutural e por estabilização energética (Rarey *et al.*, 1996), ilustrado na **Figura 3**.

**Figura 3:** Ilustração de *docking* molecular. Em azul, o receptor, e em verde, o ligante. Demonstrando a formação do complexo. Imagem gerada com o programa PyMOL (LLC, 2010).



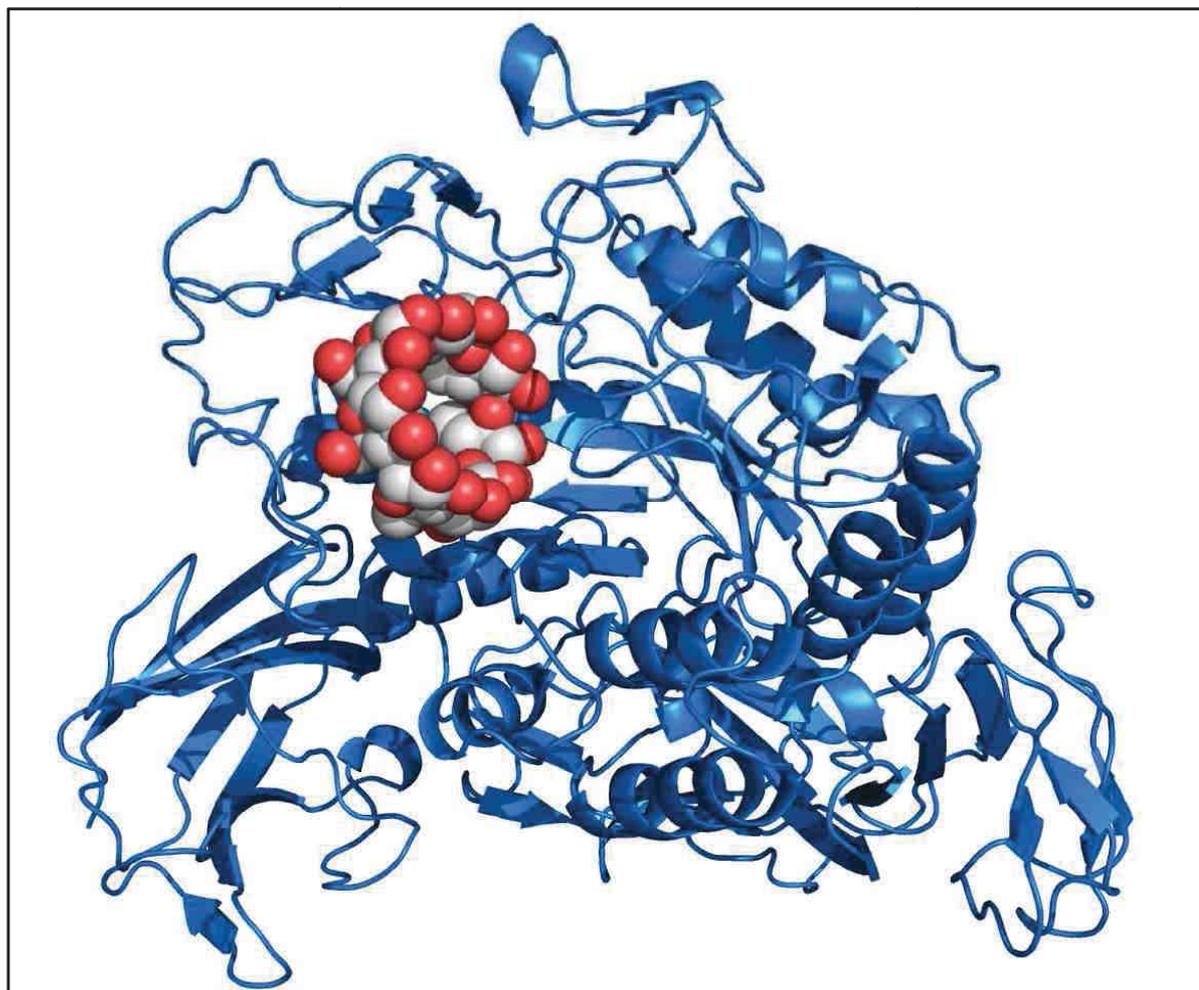
O *docking* é um método que pode ser aplicado para várias classes de moléculas, como por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), e sacarídeos. O funcionamento adequado do *docking* com esses diversos tipos de alvos depende do campo de força utilizado no cálculo. O campo de força dos programas de *docking* é normalmente ajustado para alvos protéicos, dessa forma, a utilização dessa metodologia para outros alvos, como ácidos nucleicos ou sacarídeos, requer uma maior atenção para a realização desses cálculos.

Para uma interação bem sucedida, a forma do ligante deve se ajustar ao receptor e deve ocorrer a maximização das interações intermoleculares de forma geral, como a maximização das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas, por exemplo.

Os métodos de *docking* se desenvolveram bastante nas últimas décadas. Entretanto, uma característica importante no *docking* é que é necessário possuir a estrutura tridimensional do receptor, seja ele um alvo biológico (proteína ou enzima), ou um *host* (CD), para viabilizar a sua realização. Assim, normalmente e quando disponível, a estrutura tridimensional do receptor é determinada experimentalmente por cristalografia (normalmente usando difração de Raios-X).

O banco de dados de proteína (PDB) (Berman *et al.*, 2000) é o maior e mais confiável banco de dados de estruturas de proteínas (em sua maioria) e ácidos nucleicos, totalizando cerca de 118.748 mil depósitos em maio de 2016. Em algumas dessas estruturas também é possível encontrar sacarídeos co-cristalizados. A **Figura 4** abaixo exemplifica uma estrutura de uma enzima, uma glicosiltransferase com uma  $\beta$ -CD co-cristalizada, extraída do PDB sob o código 3CGT.

**Figura 4:** Estrutura cristalográfica da enzima glicosiltransferase (Ribbon azul) com a  $\beta$ -CD co-cristalizada (esferas cinzas e vermelhas). Código PDB: 3CGT. Imagem gerada com o programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).



Uma questão adicional nos procedimentos de *docking* é o fato deles tipicamente considerarem o alvo rígido durante o cálculo, mesmo sabendo-se que eles podem possuir vários graus de liberdade conformacionais importantes, como por exemplo, os grupos laterais dos resíduos de aminoácido em proteínas, ou mesmo a conformação da própria cadeia principal da proteína. Esta questão tem sido abordada por alguns programas que consideram estes graus de liberdade do receptor durante os cálculos de *docking*, para aprimorar os resultados desta técnica que têm mimetizado, de maneira cada vez mais precisa, o processo farmacodinâmico da interação de um fármaco com o seu alvo biológico (Morris *et al.*, 2009).

Os programas de *docking* que tratam os receptores como moléculas flexíveis fazem isso apenas para moléculas de natureza protéica. Isto limita a aplicação desta abordagem, por exemplo, para sacarídeos como alvos, como é o caso dos derivados de CDs.

Entretanto, apesar destas questões levantadas aqui, os programas atuais vêm demonstrando capacidade suficiente para fornecer resultados bastante confiáveis na previsão da interação fármaco-receptor (ou ligante-alvo). Além disso, essas dificuldades tendem a ser superadas pelo rápido desenvolvimento que estes métodos e os computadores têm sofrido ao longo do tempo.

O sucesso de um programa de *docking* depende de dois fatores: o algoritmo de procura conformacional (por exemplo, algoritmo genético) e a função de pontuação (*score*, pontuação relativa para o ordenamento das soluções de *docking*). O *score*, muitas vezes, representa a energia de interação de uma solução (*pose*) de *docking* para o complexo ligante-receptor.

#### **2.1.2.1 Funções de Pontuação**

A função de *score*, *fitness* ou pontuação indica, quantitativamente, a estabilidade do complexo ligante-receptor obtido a partir de uma solução de *docking*. A equação de energia potencial para determinar o *score* de um complexo, é normalmente composta por um termo intramolecular, que mede a estabilidade relativa do receptor e do ligante individualmente, e outro termo intermolecular, que mede a interação entre o receptor e o ligante. As funções de pontuação típicas podem ser baseadas em campos de força, ser empíricas ou baseadas em conhecimento (*Knowledge-based*).

As baseadas em campos de força avaliam a estabilidade do complexo por sua energia de interação, quanto mais negativo for a energia de interação, mais estável é o complexo formado. Os campos de força utilizados possuem um formalismo matemático e parâmetros implementados internamente nos programas de *docking*, muito parecido com os utilizados na mecânica molecular (Morgon and Coutinho, 2007).

As empíricas, utilizam uma função cujos coeficientes foram pré-otimizados com base em resultados experimentais de estruturas ligante-receptor, e suas

respectivas constantes de inibição. Essas funções reproduzem dados experimentais associados a energia livre de ligação, podendo ser decomposta como uma soma de diversas funções básicas dependentes das coordenadas do ligante e do receptor. Estas funções básicas são multiplicadas pelos coeficientes que foram ajustados de tal modo a se obter uma correlação ótima para um dado conjunto de estruturas, entre as energias livres de ligação calculadas e os valores obtidos experimentalmente (constantes de inibição). Além das funções básicas, também podem ser encontradas funções individuais para interação eletrostática e a interação de van der Waals, calculadas a partir de um dado campo de força molecular clássico. Também podem possuir termos específicos para outras interações, como ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos (Morgon and Coutinho, 2007).

As baseadas em conhecimento utilizam “pseudo-potenciais” obtidos estatisticamente a partir do número, cada vez maior, de estruturas determinadas experimentalmente, capazes de descrever geometrias de interação ligante-receptor. Assim, como os métodos empíricos, essas funções tentam obter implicitamente efeitos da ligação que são difíceis de modelar de forma explícita. É importante destacar que as funções baseadas em conhecimento não são construídas mediante a utilização de dados experimentais da constante de inibição, como ocorre nas funções empíricas de energia livre. A função baseada em conhecimento utiliza a lei de Boltzmann para calcular o potencial de força média (PMF), obtido a partir da função densidade de probabilidade associada aos pares de átomos e da distância entre eles (estruturas determinadas experimentalmente) (Morgon and Coutinho, 2007).

As funções de pontuação não estão livres de imperfeições, dessa forma na tentativa de atenuar essas imperfeições surgiram as funções consenso, baseadas na combinação de diferentes tipos de funções de pontuação. A função X-CSCORE (Wang, Lai and Wang, 2002) é um exemplo de função consenso que combina funções de avaliação dos programas GOLD, DOCK e FlexX, além das funções PMF e ChemScore. A literatura mostra que o uso de funções consenso pode aumentar significativamente a taxa de sucesso na identificação da conformação do ligante observada experimentalmente. A

utilização dessas funções deve ser realizada com cuidado, uma vez que se deseja obter um balanceamento dos erros associados às diferentes funções de avaliação e não uma amplificação desses erros (Morgon and Coutinho, 2007).

As ligações de hidrogênio, possuem importância fundamental nos fenômenos biológicos, uma vez que estabilizam macromoléculas necessárias funcionamento adequado de organismos. Portanto, os programas usam um formalismo matemático especial, representado através de um termo adicional, na função de *score*, para considerar as ligações de hidrogênio. Uma ligação de hidrogênio típica é mais forte do que as interações de van der Waals, porém mais fraca do que ligações covalentes ou iônicas.

Desta forma, os programas atuais de *docking* vêm sendo usados com segurança para fornecer resultados confiáveis no que diz respeito a um amplo repertório de problemas em química medicinal. Dentre os diversos programas de *docking* existentes atualmente, podemos citar, como exemplos, o Autodock Vina (Trott e Olson, 2010) e o Autodock (Morris *et al.*, 1998), ambos "open source" e com implementações baseadas em algoritmo genético.

Em seguida será feita uma breve descrição do programa Autodock Vina, que foi utilizado no desenvolvimento desse projeto.

### **2.1.2.2 Programa Autodock Vina**

O programa Autodock Vina (VINA) foi desenvolvido no instituto de pesquisa scripps (<http://www.scripps.edu/>). O programa tem a filosofia que o usuário não precisa necessariamente compreender os detalhes de implementação, exigindo do usuário apenas as estruturas do ligante e do receptor, além do espaço de busca (como por exemplo, o sítio ativo do receptor), para realizar o cálculo. O programa VINA foi construído com a proposta de usufruir dos múltiplos núcleos individuais de processamento presentes na geração atual de computadores. Sendo assim, ele é capaz de realizar o cálculo de *docking* com um desempenho computacional significativamente melhor do que o programa Autodock, também desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa (Trott and Olson, 2010).

A função de pontuação implementada no programa VINA foi inspirada principalmente na função de *score* X-CSCORE (Wang, Lai and Wang, 2002), que leva em consideração as contribuições intra e intermoleculares. Também foram incorporadas algumas vantagens de potenciais baseados em conhecimento (“*knowledge*”) e funções empíricas (Trott e Olson, 2010). A função consta de duas partes, sendo uma dependente da conformação e outra independente. A parte dependente é definida pela **equação 6**.

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (6)$$

Onde é calculado o somatório de interações de todos os pares de átomos ( $i, j$ ), sendo normalmente levados em consideração apenas os pares de átomos separados por mais de três ligações covalentes consecutivas. Para cada átomo  $i$  é atribuído um tipo  $t_i$ . Dessa forma é definido um conjunto simétrico de funções de interação  $f_{t_i t_j}$  em função da distância interatômica  $r_{ij}$ ). Esse valor pode ser visto como a soma das contribuições intermoleculares e intramoleculares (**equação 7**).

$$c = c_{inter} + c_{intra} \quad (7)$$

O algoritmo de otimização busca o mínimo global de  $c$  e outras conformações, também de baixa energia, que são ranqueadas.

As funções de interação  $f_{t_i t_j}$  são definidas em relação à distância de superfície  $d_{ij} = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j}$ , Onde  $R_t$  é o raio de van der Waals do tipo de átomo  $t$  (Jain, 1996):

$$f_{t_i t_j}(r_{ij}) \equiv h_{t_i t_j}(d_{ij}) \quad (8)$$

Na função de pontuação do VINA, o termo  $h_{t_i t_j}$  da **equação 8** é a soma ponderada das interações estéricas, idêntica para todos os pares de átomos, interações hidrofóbicas entre átomos hidrofóbicos e, quando aplicável, ligações de hidrogênio.

Já a parte independente de conformação é definida como  $g$  na **equação 9**.

$$g(c_{inter}) = \frac{c_{inter}}{1 + wN_{rot}} \quad (9)$$

Onde  $N_{rot}$  é o número de ligações com rotações ativas entre átomos pesados do ligante, e  $w$  é o peso associado.

O algoritmo de otimização do programa VINA é derivado de várias abordagens estocásticas de otimização global, incluindo GA, otimização por enxame de partículas, *simulated annealing* e outros, combinados com vários procedimentos de otimização local (Trott and Olson, 2010).

Nesse algoritmo, são realizados sucessivos passos que consistem de uma mutação e de uma otimização local, onde cada passo é aceito conforme o critério Metropolis (Metropolis *et al.*, 1953).

O número de passos em uma execução é determinado de forma adaptativa, de acordo com a complexidade aparente do problema, e de algumas execuções partindo de conformações randômicas (Trott and Olson, 2010).

O VINA foi projetado para ser compatível com o formato de arquivos de estruturas utilizado no AutoDock4 (PDBQT), para facilitar o uso do programa com os softwares auxiliares já existentes. Os arquivos PDBQT podem ser vistos como uma extensão do formato de arquivos PDB (Trott and Olson, 2010).

O tempo gasto na busca pelo mínimo global é variável e dependente do número de átomos, da flexibilidade (ligante e resíduos flexíveis) e de outros fatores. É possível reduzir a probabilidade de não se encontrar o mínimo global da função de pontuação, através do ajuste do parâmetro *exhaustiveness*. Por padrão, o valor do parâmetro *exhaustiveness* é 8, mas aumentando-se esse valor, aumenta-se o tempo (demanda computacional) linearmente, e diminui-se, de forma exponencial, a probabilidade de não encontrar o mínimo global.

### 2.1.3 Biblioteca OpenBabel

OpenBabel (O'Boyle, Banck, *et al.*, 2011) é uma ferramenta gratuita, de código aberto (*open-source*), projetada inicialmente para facilitar a conversão de dados químicos de um formato de arquivo, para outro. Permite buscar, converter, analisar e armazenar dados de modelagem molecular, químicos, bioquímicos e de outras áreas relacionadas. Ele fornece programas prontos para serem utilizados, bem como também uma biblioteca em C++ para fomentar o desenvolvimento de outros softwares científicos de código aberto (O'Boyle, Banck, *et al.*, 2011).

Desde 2001, o OpenBabel foi desenvolvido e substancialmente expandido como um projeto de colaboração internacional, através de um modelo de desenvolvimento de código aberto. Ele possui mais de 160 mil downloads, mais de 400 citações, é utilizado por mais de 40 projetos de software, e está disponível gratuitamente a partir do site do OpenBabel ([openbabel.org](http://openbabel.org)) (O'Boyle, Banck, *et al.*, 2011).

A biblioteca OpenBabel permite que usuários desenvolvam softwares químicos sem precisar se preocupar com os detalhes de baixo nível do tratamento de informações químicas, por exemplo, ler ou escrever um formato químico específico de arquivo. Deixando assim o usuário livre para se concentrar no problema científico. A interface de programação da aplicação (API) do OpenBabel é formada por um conjunto de classes, métodos e variáveis, fornecidas para o usuário utilizar na implementação do software.

O OpenBabel apresenta diversas características, e a seguir serão destacadas as mais importantes para o desenvolvimento desse trabalho.

#### 2.1.3.1 Suporte a Formatos de Arquivos

A versão 2.3 do OpenBabel suporta um total de 111 formatos químicos, permitindo a leitura de 82 formatos e a escrita de 85 formatos. Estes formatos são utilizados em quimioinformática (SMILES, InChI, MOL, MOL2), arquivos de entrada e saída de vários pacotes de química computacional (GAMESS, Gaussian, MOPAC), formatos de arquivos de cristalografia (CIF, ShelX), formatos de reações (MDL RXN), formatos de arquivos usados em pacotes de

dinâmica molecular e *docking* (Autodock, Amber), formatos utilizados por pacotes para desenho de estruturas em 2D (ChemDraw), visualizadores 3D (Chem3D, Molden) e cinética química e termodinâmica (ChemKin, Termo) (O'Boyle, Banck, *et al.*, 2011).

### 2.1.3.2 Campos de Força (OpenBabel)

O OpenBabel disponibiliza classes de mecânica molecular, que podem ser usadas preferencialmente com moléculas pequenas. Aplicações típicas dessas classes incluem avaliação energética e minimização de energia (otimização de geometria), podendo ser utilizadas individualmente, ou fazendo parte de um grande fluxo de trabalho. Os campos de força implementados no OpenBabel permitem a utilização desses métodos para uma grande maioria de estruturas moleculares.

O campo de força MMFF94(s) pode ser utilizado para moléculas orgânicas ou com potencial farmacêutico. Para moléculas contendo qualquer elemento da tabela periódica ou de geometria complexa (ou seja, não suportados pelo MMFF94), o campo de força UFF pode ser utilizado. A implementação do campo de força GAFF também foi realizada, mas em um momento mais recente, portanto não foi otimizado, em questões de velocidade, como MMFF94 e UFF foram. Todos os campos de força permitem a aplicação de restrições em determinadas posições atômicas ou em distâncias específicas.

Para realizar a minimização de energia, o OpenBabel tem implementado os algoritmos *Steepest Descent* e Gradientes Conjugados. Parâmetros como o número de passos e o critério de convergência podem ser ajustados para realizar a minimização. Além dos algoritmos de minimização de energia, o OpenBabel ainda disponibiliza a aplicação de dinâmica molecular para a otimização de estruturas.

Alguns métodos de busca conformacional foram implementados utilizando campos de força, todos baseados na abordagem "*torsion-driving*", que significa conduzido por torções. Essa abordagem se baseia em ajustar os ângulos de torção a partir de um conjunto predefinido de valores permitidos para uma ligação com rotação livre, em particular. O método de busca mais preciso implementado é o método de busca sistemática, o método avalia de forma

iterativa todos os ângulos de torção para cada ligação com rotação livre da molécula, mantendo o confômero com menor energia. Uma busca sistemática pode não ser computacionalmente viável para uma molécula com vários graus de liberdade, dessa forma, também estão disponíveis alguns métodos estocásticos de busca. A busca aleatória gera valores aleatórios para os ângulos de torção, a partir de valores pré-definidos. Já a busca ponderada, é um método de busca estocástica que converge a um confômero de baixa energia, ponderando ângulos de torção particulares. Esse ângulos são ponderados com base na energia relativa do confômero já gerado (O'Boyle, Banck, *et al.*, 2011; O'Boyle, Vandermeersch, *et al.*, 2011).

Também está disponível um algoritmo de busca conformacional baseado em algoritmo genético. Ele permite a aplicação de filtros (ex: um filtro de diversidade) e diferentes funções de pontuação. Esse método pode ser aplicado para buscar por um confômero de baixa energia, como os outros métodos, ou pode ser utilizado para gerar uma biblioteca de confômeros diversos. As funções de pontuação disponíveis na busca baseada em GA podem ser baseadas em Energia ou RMSD ("Root Mean Square Deviation"). A função de pontuação baseada em energia busca por confômeros mais estáveis, enquanto a baseada em RMSD busca por um conjunto diverso de conformações (O'Boyle, Banck, *et al.*, 2011; O'Boyle, Vandermeersch, *et al.*, 2011).

Diversas aplicações fazem uso da biblioteca OpenBabel, tais como: Avogadro, Confab, iBabel, OpenMD, PyRx, RMG, Pharao, Stripper, Zodiac, dentre outros (O'Boyle, Banck, *et al.*, 2011). A biblioteca Avogadro foi utilizada no desenvolvimento desse projeto e será discutida em mais detalhes.

### **2.1.3.3 Avogadro**

O Avogadro é um visualizador e editor molecular avançado, tendo sido projetado para ser usado em várias plataformas (Windows, Linux e Mac OS) nas áreas de modelagem molecular, química computacional, bioinformática e áreas afins. Ele oferece flexibilidade, renderização de alta qualidade e uma poderosa arquitetura baseada em *plugins*. Os usos típicos do visualizador incluem a construção de estruturas moleculares, formatação de arquivos de

entrada e análise de arquivos de saída para uma grande variedade de pacotes de química computacional. Utiliza o formato de arquivo CML (*chemical markup language*) como formato nativo. O Avogadro foi desenvolvido utilizando-se a linguagem de programação C++, o framework gráfico Qt foi utilizado para construir a interface gráfica de usuário (GUI), o OpenGL foi utilizado para visualização em 3D, assim como também a biblioteca OpenBabel. Utilizando essa combinação de linguagens e bibliotecas, necessariamente o Avogadro é licenciado sob a licença GNU GPLv2 (“GNU General Public License v 2.0,” 2012), o que o torna aberto e disponível para todos (Hanwell *et al.*, 2012). O Avogadro, além de ser uma aplicação nativa, também é uma biblioteca, o que permite que suas ferramentas possam ser incorporadas no desenvolvimento de outros softwares.

É importante ressaltar que as metodologias destacadas na sessão de modelagem molecular não se limitam a uma única classe de moléculas, como as proteínas, podendo também ser aplicados para moléculas de outra natureza, como por exemplo, os sacarídeos (CDs e seus derivados).

## 2.2 Complexos de Inclusão

Nos medicamentos, todo fármaco (princípio ativo) necessita de certo grau de solubilidade em água para ser farmacologicamente ativo, mas também necessita de alguma lipofilicidade, para ser capaz de permear através das membranas biológicas via difusão passiva (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

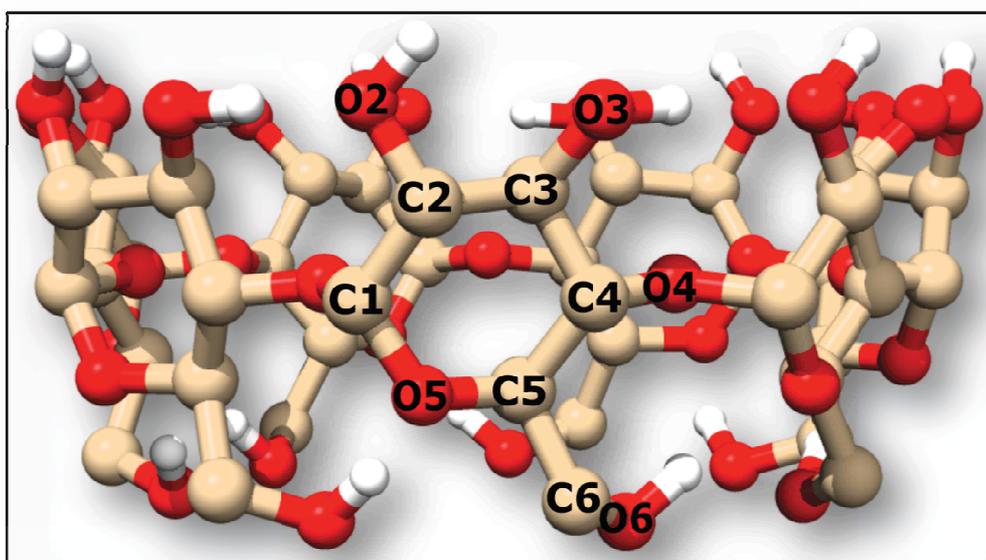
O uso de abordagens de varredura de alto desempenho (*high-throughput screening*) no desenvolvimento de fármacos permitiu a identificação de um grande número de moléculas lipofílicas com potencial farmacodinâmico, no entanto muitas dessas moléculas têm sua utilidade clínica inviabilizada devido à baixa solubilidade em água (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008), ou seja, um inadequado perfil farmacocinético. A formação de complexos de inclusão é uma estratégia capaz de promover alterações nas propriedades físico-químicas e biológicas dessas moléculas, de forma aparente, principalmente aumentando a solubilidade em água. As CDs vêm sendo amplamente aplicadas no desenvolvimento de fármacos e medicamentos, principalmente através da obtenção de complexos de inclusão (Oliveira, Santos and Coelho, 2009).

### 2.2.1 Ciclodextrinas

Com já foi dito na introdução, as CDs são uma família de oligossacarídeos cíclicos, cujas estruturas são formadas por unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4. Devido à conformação em cadeira das unidades de glicopiranosose, as CDs possuem a forma de um tronco de cone, com grupos hidroxila primários na borda estreita, e grupos hidroxila secundários que se prolongam a partir da extremidade mais larga (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008; Kurkov and Loftsson, 2013).

As orientações individuais das unidades de glicopiranosose apresentam grupos hidroxilas em ambas as bordas do cone, o que tornam as CDs solúveis em água. O interior da cavidade, no entanto, tem caráter hidrofóbico, uma vez que é composto pelos átomos de hidrogênio C3-H, C5-H e C6-H e pelo oxigênio O4 do tipo éter. Consequentemente a cavidade, quando em solução aquosa, fornece uma matriz hidrofóbica que permite a formação de complexos de inclusão com moléculas apolares ou pouco polares (Saenger *et al.*, 1998). A **Figura 5** é uma representação esquemática da CD.

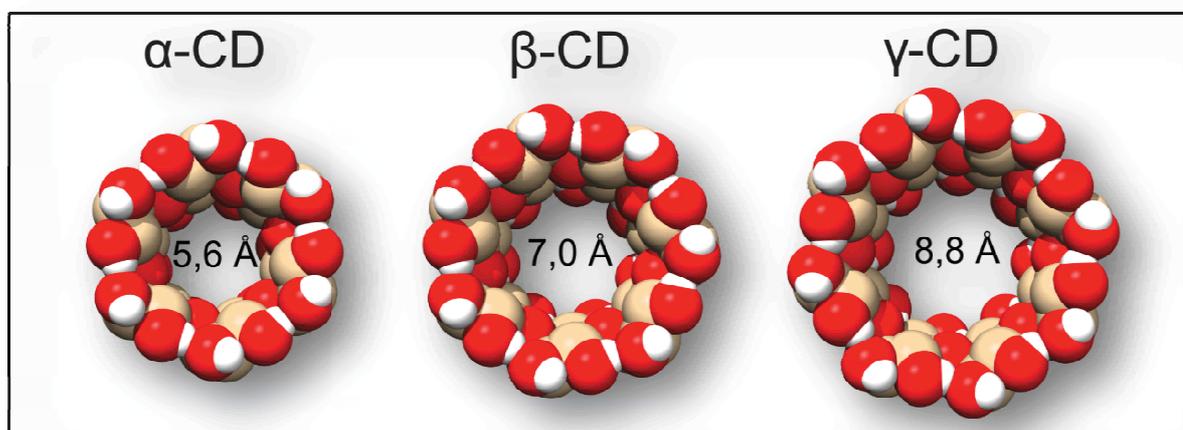
**Figura 5:** Figura esquemática de uma CD. Em cor bege, os átomos de carbono, e em cor vermelha e branca, os átomos de oxigênio e hidrogênio, respectivamente. Os átomos de carbono C2 e C3 estão ligados às hidroxilas secundárias e o átomo C6 está ligado à hidroxila primária. Os hidrogênios não apolares estão implícitos. Imagem gerada com o programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).



As CDs naturais são  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD), com 6, 7 e 8 unidades de glicopiranosose, respectivamente. A diferença na quantidade de unidades de glicopiranosose ligadas determina o tamanho da cavidade da CD, como pode ser observado na **Figura 6**. Estas CDs são formadas através de uma reação de transglicosilação intramolecular, quando a amilose do amido é processada pelas glicosiltransferases (CGTase; EC 2.4.1.19), enzimas monoméricas de origem bacteriana (Schmidt *et al.*, 1998).

A solubilidade aquosa das CDs é bem menor do que a das dextrinas lineares (amiloses), provavelmente devido à forte interação das moléculas de CD na forma cristalina. Além disso, a  $\beta$ -CD, por exemplo, forma ligações de hidrogênio intramoleculares que diminuem sua habilidade de formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água (solvente) ao redor, o que diminui ainda mais a sua solubilidade aquosa (Kurkov and Loftsson, 2013; Loftsson, Hreinsdóttir and Másson, 2007).

**Figura 6:** Representação das CDs naturais,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, com o diâmetro de suas cavidades. Imagem gerada com o programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).



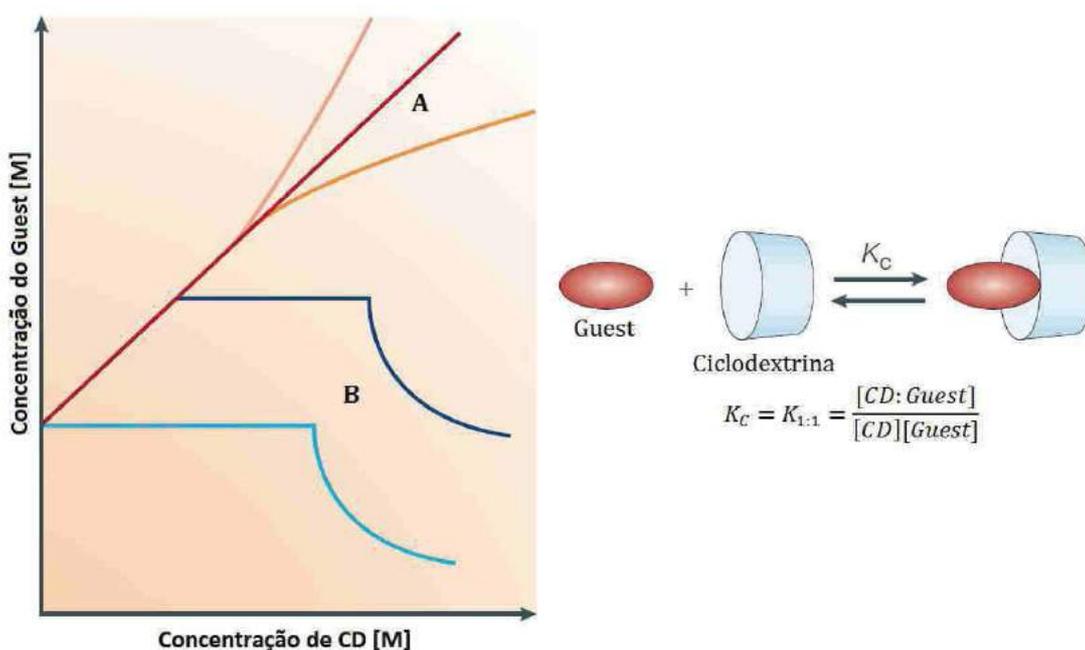
As CDs são capazes de formar complexos de inclusão com muitos fármacos em solução aquosa, conseguindo incluir o *guest* por completo, ou uma parte lipofílica dele, dentro da sua cavidade. No processo de formação do complexo nenhuma ligação covalente é formada ou quebrada, contudo é estabelecido um equilíbrio entre o complexo *host:guest* e as moléculas *host* e *guest* livres em solução. As principais forças responsáveis pela formação do complexo de

inclusão incluem: ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e o deslocamento das moléculas de água de dentro para fora da cavidade da CD (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

As moléculas de CD envolvidas em complexos possuem propriedades físico-químicas distintas das moléculas livres em solução. Portanto, é possível determinar a constante de equilíbrio de formação dos complexos, assim como a sua estequiometria, observando-se as mudanças nas propriedades físico-químicas durante o processo de formação dos complexos (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

Os complexos de inclusão podem ser classificados com base nos efeitos causados na solubilidade do *guest* em água, e o diagrama de fases de solubilidade é capaz de indicar o perfil do complexo de inclusão, como pode ser observado na **Figura 7**. O perfil do tipo A é obtido quando a solubilidade do *guest* aumenta com o aumento da concentração da CD. O perfil do tipo A representa a formação de complexos de inclusão solúveis, enquanto o perfil do tipo B indica a formação de complexos com solubilidade limitada. (Davis and Brewster, 2004).

**Figura 7:** Perfis de solubilidade de fases e representação do equilíbrio CD:Guest. Figura adaptada (Davis and Brewster, 2004).



De forma geral, os derivados de CDs solúveis em água possuem um perfil de solubilidade do tipo A, enquanto que as CDs naturais (menos solúveis) apresentam o perfil do tipo B.

Acredita-se que a maioria dos complexos formados por fármacos e CDs são complexos de inclusão *host:guest*, mas sabe-se também que as CDs são capazes de dissolver fármacos através da formação de complexos agregados (estruturas semelhantes a micelas). Como o perfil de solubilidade descreve apenas a influência do aumento da concentração de CD na solubilidade do fármaco, não é possível confirmar a formação do complexo de inclusão através do estudo de solubilidade de fases. Por outro lado, é possível calcular a constante de equilíbrio ( $K_{1:1}$ ) do complexo de inclusão a partir do gradiente (inclinação da reta) e da solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) do *guest* em água (solubilidade do *guest* na ausência de CD), como pode ser visto na **equação 10** (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

$$K_{1:1} = \frac{\text{Gradiente}}{S_0(1-\text{Gradiente})} \quad (10)$$

A eficiência de complexação (EC) pode ser estimada para complexos *host:guest* com estequiometria 1:1, a partir do gradiente do diagrama de solubilidade de fases conforme a **equação 11** (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

$$EC = \frac{\text{Gradiente}}{(1-\text{Gradiente})} = \frac{[\text{CD:Guest}]}{[\text{CD}]} \quad (11)$$

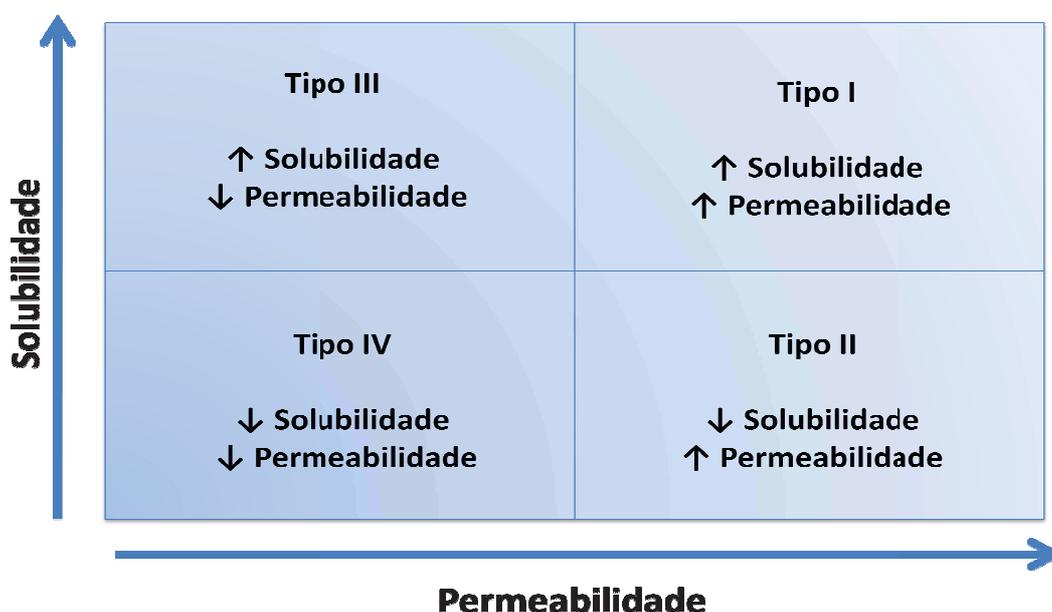
Para confirmar a formação do complexo de inclusão, é necessário utilizar outras abordagens experimentais de análise, como por exemplo: análise espectroscópica de Raman e infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN), análises térmicas e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fortes *et al.*, 2013).

Os efeitos que as CDs produzem nas propriedades das formulações farmacêuticas serão discutidos a seguir.

## Solubilidade

Para um fármaco ser disponível oralmente, o composto precisa se dissolver para ser absorvido através do trato gastrointestinal, de maneira que possa atingir uma concentração adequada no sítio ativo, para garantir que a ação farmacológica desejada seja alcançada. Estudos mostram que mais que 40% das falhas no desenvolvimento de fármacos podem ser atribuídas a fármacos com baixa dissolução ou baixa permeabilidade (Davis and Brewster, 2004). Em reconhecimento a importância desses fatores, o FDA e outras organizações reguladoras de fármacos definiram o sistema de classificação biofarmacêutico. Este sistema classifica os fármacos em quatro tipos, com base nas características de solubilidade e permeabilidade, como pode ser visto na **Figura 8** (Davis and Brewster, 2004).

**Figura 8:** Sistema de classificação biofarmacêutico, que apresenta a caracterização dos fármacos com base nos valores de solubilidade e permeabilidade.



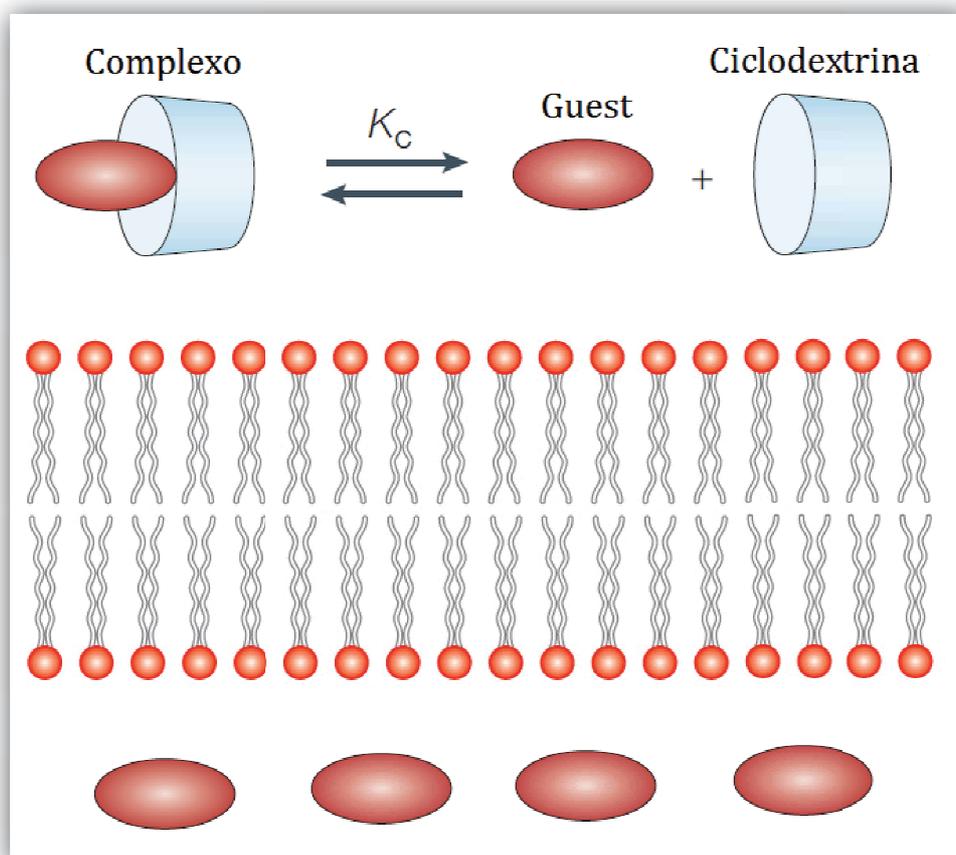
Dessa forma, as CDs possuem um papel importante na formulação de medicamentos com fármacos que apresentam baixa solubilidade em água, fazendo com que uma molécula do tipo II possa se comportar como uma substância do tipo I, melhorando sua solubilidade aparente e

consequentemente a biodisponibilidade da droga através da formação de complexos de inclusão (Davis and Brewster, 2004).

### Biodisponibilidade

A CD não é capaz de atravessar prontamente as membranas biológicas, devido a sua estrutura química, alto peso molecular e baixo coeficiente de partição octanol/água. Apenas a forma livre do fármaco, que está em equilíbrio com o complexo *host:guest*, é capaz de permear as membranas de interior tipicamente lipofílico (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008). Portanto, ajustando alguns fatores que afetam o equilíbrio de formação do complexo de inclusão, é possível otimizar a disponibilidade do fármaco na forma livre nas barreiras biológicas, como pele, mucosa e córnea ocular (**Figura 9**), por exemplo. É importante utilizar as quantidades adequadas de fármaco e de CD na formulação, uma vez que o excesso de CD pode diminuir a disponibilidade do fármaco (Challa *et al.*, 2005; Uekama, Hirayama and Irie, 1998).

**Figura 9:** Representação da permeabilidade de fármacos hidrofóbicos encapsulados por CDs. Figura inspirada (Challa *et al.*, 2005).



Nos casos de fármacos solúveis em água, as CDs aumentam a permeabilidade da droga por ação direta nas membranas. As CDs podem perturbar a integridade da membrana, o que contribui para a absorção e toxicidade. A habilidade das CDs em remover moléculas de colesterol das membranas pode aumentar a sua fluidez e induzir invaginações (Challa *et al.*, 2005).

As formulações, de forma geral, contêm uma grande quantidade de excipientes farmacêuticos, que podem competir com o fármaco pela cavidade da CD. Essa competição também pode ocorrer envolvendo substâncias endógenas, existentes no sítio de absorção do fármaco. O deslocamento do fármaco da cavidade da CD para sua forma livre, por substâncias endógenas ou exógenas no sítio de absorção, causa uma maior biodisponibilidade do fármaco (Tokumura *et al.*, 1986).

### **Estabilização**

Os fármacos necessitam manter uma estabilidade suficiente não apenas durante o armazenamento, mas também perante os fluidos gastrointestinais, evitando que ocorram reações que resultem em produtos farmacologicamente inativos, ou menos ativos, que irão reduzir a eficácia terapêutica (Uekama, Hirayama and Irie, 1998).

A viabilidade de uma formulação farmacêutica pode ser limitada por problemas de estabilidade, especialmente as formulações aquosas de drogas que são propensas a sofrer hidrólise ou oxidação. A velocidade da reação de degradação pode ser reduzida pela inclusão de grupos quimicamente reativos do fármaco na cavidade da CD. Em soluções contendo um complexo *host:guest* (1:1) onde o *guest* (fármaco) é instável, a velocidade de degradação do fármaco é a média ponderada entre as velocidades de degradação do fármaco livre e na forma de complexo com a CD (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

Muitos estudos mostram que a estabilidade de compostos quimicamente reativos, como esteróides, agentes alquilantes (anticâncer), prostaglandinas, pró-fármacos, e vários outros compostos, pode ser melhorada

significativamente através da utilização de CDs na preparação das formulações. Os estudos também revelam que as CDs podem aumentar a estabilidade física de vários fármacos. Como por exemplo, reduzir significativamente a taxa de evaporação de compostos voláteis através da formação de complexos. A CD também pode proteger formulações com peptídeos e proteínas contra a desnaturação (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

Por outro lado, as CDs também podem desestabilizar os fármacos, através da catálise direta de reações de decomposição dos mesmos. Esse efeito está associado à desprotonação de grupos hidroxila da CD, sendo mais observado sob condições básicas. Por exemplo, o aumento na solubilidade de drogas em suspensão aquosa acarreta em uma desestabilização da mesma (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

### **Diminuição da toxicidade local (Segurança)**

O aprisionamento do fármaco dentro da cavidade da CD pode prevenir o contato do fármaco livre com superfícies biológicas, reduzindo a penetração do mesmo em células de tecidos periféricos e, conseqüentemente, minimizando a irritação local. (Uekama, Hirayama and Irie, 1998).

### **2.2.2 Derivados de Ciclodextrinas**

No processo de síntese de derivados de CD é importante controlar a razão de substituição molar (MS), para se conseguir balancear a solubilidade em água e a capacidade de formar complexos de inclusão. O aumento do grau de substituição melhora a solubilidade em água do complexo, porém prejudica a capacidade de formar os complexos devido ao impedimento estérico no *host* (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998). A razão de MS é calculada dividindo o número total de grupos substituintes presentes, pelo número de unidades de glicopiranosose (Treib *et al.*, 1999).

Os substituintes volumosos reagem preferencialmente com as hidroxilas primárias OH(6), uma vez que são as mais acessíveis estericamente. As hidroxilas secundárias OH(2) possuem a acidez mais alta (pKa = 12,2). Em condições anidras, ela pode ser seletivamente desprotonada e permitir a

reação com reagentes eletrofílicos. Os grupos hidroxila secundários OH(3) são os menos reativos e podem reagir apenas depois que os grupos OH(2) e OH(6) forem bloqueados. (Wenz, 1994).

Durante o processo de síntese, derivados homólogos com menor e maior razões de MS são também formados em adição ao produto, e a separação desses homólogos é significativamente difícil. A síntese de derivados de CD uniformes é mais cara e desafiadora, e requer reagentes seletivos (sínteses regioseletivas), otimização das condições reacionais e boa separabilidade dos produtos. Portanto, é mais fácil encontrar derivados de CD na forma de misturas estatísticas com uma razão de MS particular, do que derivados de CD uniformes (Wenz, 1994).

A substituição de qualquer um dos grupos hidroxila, mesmo que por grupos substituintes contendo partes hidrofóbicas, como o grupo metóxi, resulta em um aumento considerável da solubilidade aquosa. O aumento da quantidade de hidroxilas substituídas aumenta a solubilidade da  $\beta$ -CD (em água fria) até que aproximadamente 2/3 dos grupos hidroxilas sejam substituídos, e depois decresce novamente com o aumento das substituições (Loftsson and Duchêne, 2007).

A síntese do derivado (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), o mais utilizado na indústria farmacêutica, resulta em um sistema isomérico que é 32 vezes mais solúvel em água do que a  $\beta$ -CD (Loftsson and Duchêne, 2007), provavelmente devido à mistura de homólogos resultante do processo de síntese, que previne qualquer cristalização. De forma geral, os derivados alquilados de CDs apresentam uma solubilidade em água e em etanol maior que 50% (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998).

A habilidade de inclusão das CDs sulfoalquiladas depende não apenas da razão de MS, mas também do espaçamento entre o grupo substituído e o tronco de cone da CD. A estabilidade do complexo envolvendo o *host* sulfobutiléter- $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD) aumenta com o aumento do espaçamento do substituinte, isso porque os grupos carregados, como no caso da SBE- $\beta$ -CD, estão devidamente espaçados da cavidade, e a hidrofobicidade da cavidade aumenta devido à presença da cadeia alquil mais longa no substituinte. Além

disso, existe um número ótimo de grupos sulfoalquil substituídos na CD, e valores acima desse número resultam em um derivado incapaz de formar complexos de inclusão mais estáveis (Uekama, Hirayama and Irie, 1998).

Quando um mono ou dissacarídeos são introduzidos em um ou dois pontos de substituição primários da CD, e sua solubilidade em água aumenta de forma significativa, esse derivados são chamados de CDs ramificadas. Essas CDs são preparadas enzimaticamente e o derivado obtido possui uma estrutura única, diferentemente dos derivados alquilados e sulfoalquilados (YOSHIMU; KITAHATA; OKADA, 1987).

A habilidade de inclusão das CD ramificadas frente aos *guests* hidrofóbicos é comparável com a habilidade das CDs originais, e diminui muito levemente com o aumento do grau de substituição. Contudo, o efeito de solubilização das CDs ramificadas é muito maior do que o das CDs naturais. Isso possibilita a preparação de soluções com concentrações acima de 50% de fármaco. As CDs ramificadas podem ser úteis como solubilizantes em preparações parenterais, por causa da sua baixa atividade hemolítica, alta biocompatibilidade, e sua alta capacidade de solubilizar fármacos (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998).

Na sessão seguinte serão discutidos trabalhos de modelagem molecular no âmbito dos complexos de inclusão.

### **2.3 Modelagem Molecular envolvendo CDs em complexos de inclusão**

Essa revisão da literatura tem como objetivo apresentar o estado da arte dos estudos de modelagem molecular envolvendo complexos de inclusão com CDs e seus derivados.

Em 1998, foi publicada uma revisão sobre as aplicações de metodologias *in silico* no estudo das CDs, destacando-se que o uso dessas metodologias no escopo das CDs é desafiador, uma vez que as CDs não são moléculas pequenas, possuem vários graus de liberdade e são geralmente estudadas experimentalmente em ambientes aquosos (Lipkowitz, 1998).

A aplicação da modelagem molecular nos estudos de complexos de inclusão envolvendo CDs e seus derivados geralmente tem como objetivo a elucidação

das interações intermoleculares do complexo *host:guest*. Nestes estudos, geralmente, são utilizadas uma combinação de técnicas de modelagem molecular, dentre elas, *docking*, mecânica molecular, química quântica e dinâmica molecular.

O método mais encontrado na literatura para descrever essas interações parece ser o *docking molecular*. Diversos programas foram relatados nos estudos envolvendo as CDs: Dock4 (Shoichet, Bodian and Kuntz, 1992), FlexiDock (Sybly 6.7), Dock (Sybyl6.7), AUTODOCK (Morris *et al.*, 1998), Surfex-Dock (Jain, 2003), Gold (Jones *et al.*, 1997) e Vina (Trott and Olson, 2010). As funções de pontuação desses programas, em sua maioria, estão calibradas para alvos protéicos, o que suscita precaução adicional na utilização dessa metodologia isolada para o estudo das CDs (polissacarídeos).

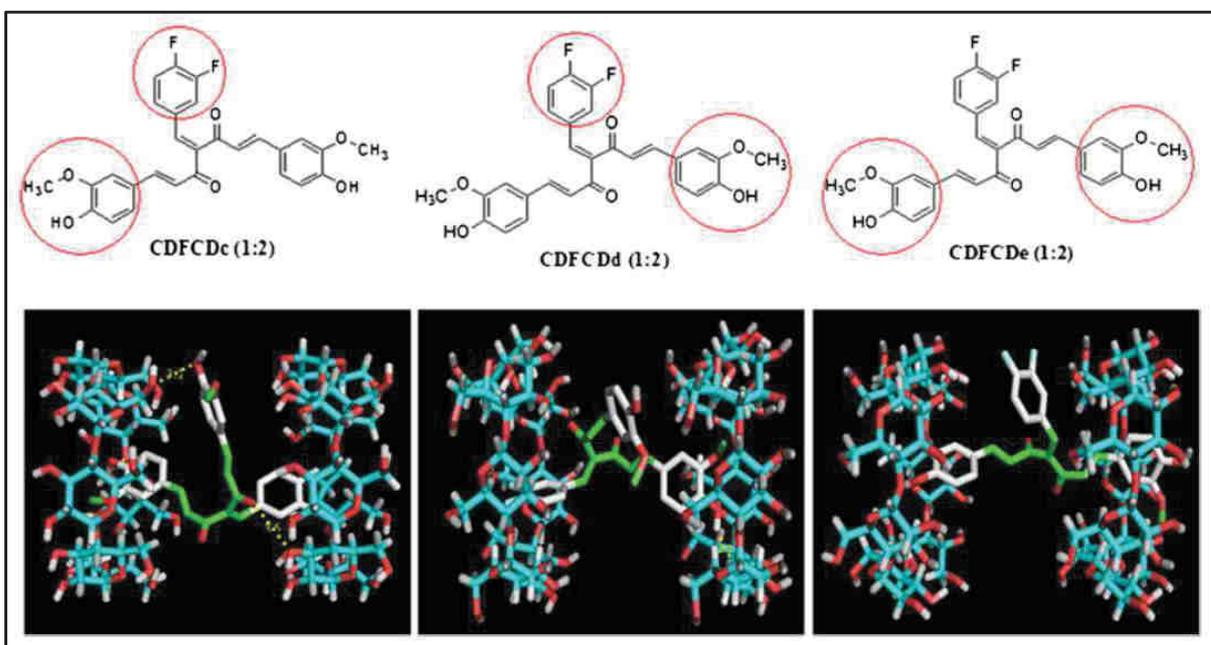
Leila *et al.* realizaram um estudo fundamentado na modelagem molecular do complexo de inclusão entre o ácido *para*-nitrobenzóico e a  $\beta$ -CD, sendo o *guest* considerado tanto na forma neutra, quanto na forma aniônica. Foram utilizados os programas Hyperchem 7.51 (“Hyperchem,” 2002) e Gaussian 03 (FRISCH *et al.*, 2003) para realizar este estudo. As estruturas otimizadas dos *guests* foram obtidas aplicando-se o método de química quântica B3LYP/6-31G\* (FRISCH *et al.*, 2003) e a estrutura da  $\beta$ -CD foi otimizada utilizando-se o método semi-empírico PM3 (Stewart, 1989). As geometrias otimizadas dos complexos de inclusão foram obtidas aplicando-se o campo de força MM+ (“Hyperchem,” 2002) a medida que as estruturas do *host* e do *guest* foram sendo aproximadas. Os complexos mais estáveis foram otimizados novamente aplicando-se o método semi-empírico PM3. O complexo formado pelo ácido *para*-nitrobenzóico aniônico se mostrou significativamente mais favorável que os outros. Também foi observado que o anel aromático do *guest* de cada modelo ficou completamente embutido na cavidade da  $\beta$ -CD (Leila *et al.*, 2011).

Seridi *et al.* realizaram um trabalho também utilizando os programas Hyperchem (“Hyperchem,” 2002) e Gaussian (Frisch *et al.*, 2009), além do programa MOPAC (Stewart, 2012). Este estudo de modelagem envolveu diversos métodos incluindo os semi-empíricos (química quântica)

(“Hyperchem,” 2002). Os resultados *in silico* deste estudo estão de acordo com os resultados obtidos experimentalmente (Seridi *et al.*, 2013).

Dalke *et al.* realizaram o estudo de *docking* entre um novo análogo da Curcumina (CDF) e a  $\beta$ -CD, utilizando o programa VINA. Além do complexo 1:1 (*host:guest*), também foi realizado o estudo da interação entre 2 moléculas de  $\beta$ -CD para 1 molécula de CDF (2:1). Para isso, a estrutura da  $\beta$ -CD foi construída na forma de um dímero, usando-se o programa VMD (Humphrey, Dalke and Schulten, 1996). Após a construção, a estrutura contendo duas moléculas de  $\beta$ -CD teve sua energia minimizada utilizando-se o servidor PRODRG (Schuttelkopf and Aalten, Van, 2004). Os resultados obtidos estão de acordo com os dados de ressonância magnética nuclear (RMN), confirmando que os dois anéis aromáticos da Curcumina estão envolvidos na formação do complexo de inclusão estável, através da formação de ligações de hidrogênio com a  $\beta$ -CD, como pode ser observado na **Figura 10** (Dandawate *et al.*, 2012).

**Figura 10:** Geometrias dos complexos de inclusão  $\beta$ -CD:CDF (2:1), formados no estudo de *docking* molecular. Figura extraída do artigo citado no texto (Dandawate *et al.*, 2012).



Existe um grande número de trabalhos envolvendo CDs que utiliza métodos de mecânica molecular e dinâmica molecular (Anselmi *et al.*, 2006; Boonyarattanakalin, Wolschann and Lawtrakul, 2011; Górnas *et al.*, 2009;

Seridi and Boufelfel, 2011). O estudo realizado por Górnas *et al.* envolveu a formação de complexos de inclusão entre os ácidos clorogênico e caféico, com a  $\beta$ -CD como *host*. Este estudo foi capaz de confirmar as observações experimentais de formação do complexo de inclusão (Górnas *et al.*, 2009). Desta forma, existe uma vasta literatura sobre complexos de inclusão em CDs.

Mura *et al.* realizaram um estudo de modelagem molecular da interação entre o *guest* naproxeno e derivados da  $\beta$ -CD com substituintes hidroxialquil, considerando diferentes razões de MS. Nesse estudo, os derivados foram construídos adicionando-se 4 (MS=0,6), 6 (MS=0,9), 7 (MS=1,0) e 10 (MS=1,6) grupos hidroxialquil à  $\beta$ -CD. Seis isômeros de posição foram construídos para o derivado com 4 substituintes, enquanto que três isômeros de posição foram construídos para cada uma das outras três substituições molares (MS). Esse estudo serviu como referência para outros trabalhos na definição do modelo *in silico* aplicado no estudo de modelagem molecular (Mura *et al.*, 1995).

Illapakurthy *et al.* tiveram a preocupação de comparar três programas de *docking*, com o objetivo de prever o modo de ligação no complexo formado entre o derivado HP- $\beta$ -CD e as moléculas de artemisina, artether, dihidroartemisina e 10-desoxiartemisina. A estrutura da  $\beta$ -CD foi obtida do banco de dados PDB (<http://www.pdb.org>) pelo código 1BFN. Já a estrutura da HP- $\beta$ -CD foi construída com base na estrutura da  $\beta$ -CD (Mura *et al.*, 1995), respeitando a razão de MS de 0,6. Quatro grupos HP foram adicionados às hidroxilas primárias, (Illapakurthy *et al.*, 2003). Os programas utilizados foram: FlexiDock, Dock (ambos do Sybyl 6.7) e o DOCK 4.0.1. O programa DOCK 4.0.1 apresentou uma melhor correlação em termos do modo de inclusão e da função de pontuação no *docking*, para calcular os complexos de inclusão, sendo assim uma melhor opção frente aos outros dois testados (Illapakurthy *et al.*, 2003).

Liu *et al.* fizeram um estudo de modelagem da molécula acitretina como *guest* para os seguintes derivados de CDs como *hosts*: dimetil- $\beta$ -CD (DM- $\beta$ -CD) e HP- $\beta$ -CD, onde 4 moléculas de HP foram adicionados às hidroxilas primárias da  $\beta$ -CD (Mura *et al.*, 1995). As estruturas foram submetidas individualmente à otimização de geometria, utilizando-se o campo de força MMFF94s, disponível no software Sybyl 6.6 (Tripos). Em seguida, foi realizado

o *docking* utilizando-se também o módulo Dock disponível no Sybyl, o que mostrou que a interação entre a acitretina e a DM- $\beta$ -CD deve ser mais estável do que entre a acitretina e a HP- $\beta$ -CD, corroborando com os resultados de solubilidade de fases (Liu *et al.*, 2003).

Alguns autores utilizam o termo *docking* manual para descrever os estudos de modelagem molecular que têm o objetivo de otimizar a estrutura do complexo *host:guest* (Anselmi *et al.*, 2006; Araujo, de *et al.*, 2008), à partir de uma definição manual inicial das posições relativas entre *host* e *guest*.

No trabalho de Araujo *et al.*, foi realizado o estudo do complexo entre o *guest* benzenosulfonamida e o derivado HP- $\beta$ -CD, sendo a inclusão na HP- $\beta$ -CD simulada manualmente, fazendo-se com que o *guest* percorresse de uma ponta da CD a outra, passando pela cavidade, utilizando o método de mecânica molecular com o campo de força MM3 (Allinger, Yuh and Lii, 1989). Em seguida, a estrutura mais estável encontrada foi otimizada, sem nenhuma restrição de geometria, utilizando-se os métodos semi-empíricos PM6 (Stewart, 2007) e RM1 (Rocha *et al.*, 2006), implementados no programa CAChe ("CAChe," 2000). O efeito solvente foi levado em consideração através da utilização do modelo COSMO (Klamt and Schüürmann, 1993). Foi possível constatar, em conjunto com técnicas de espectroscopia e de ressonância magnética nuclear (RMN) 2D, que a orientação preferível do complexo com os derivados de CD envolve a presença do anel de anilina da molécula *guest* dentro da cavidade do *host* (Araújo, de *et al.*, 2008).

Hazai e colaboradores desenvolveram um *web-service*, Cyclodextrin KnowledgeBase, que possui quatro módulos: Publicações, Interações, Quiralidade e Análise. O módulo análise é capaz de prever a geometria do complexo CD:*guest* usando ferramentas de *docking* molecular, assim como a energia de ligação do complexo. A predição da geometria do complexo para derivados de CDs é possível devido a um banco de dados com 133 estruturas de derivados de CDs (HAZAI *et al.*, 2010).

Um estudo de *docking* foi realizado utilizando-se o programa VINA. O estudo envolveu o *guest* variconazol e os derivados HP- $\beta$ -CD e 2-O-metil- $\beta$ -CD. Foi considerada a razão de MS (0,99), através da adição de 7 substituintes HP,

sendo 4 posicionados nas hidroxilas OH(6), e as 3 restantes na posição OH(2). Já para o derivado 2-O-metil- $\beta$ -CD com razão de MS de 0,57, foram posicionados 4 grupos substituintes metila nas posições OH(2) (Miletic *et al.*, 2013).

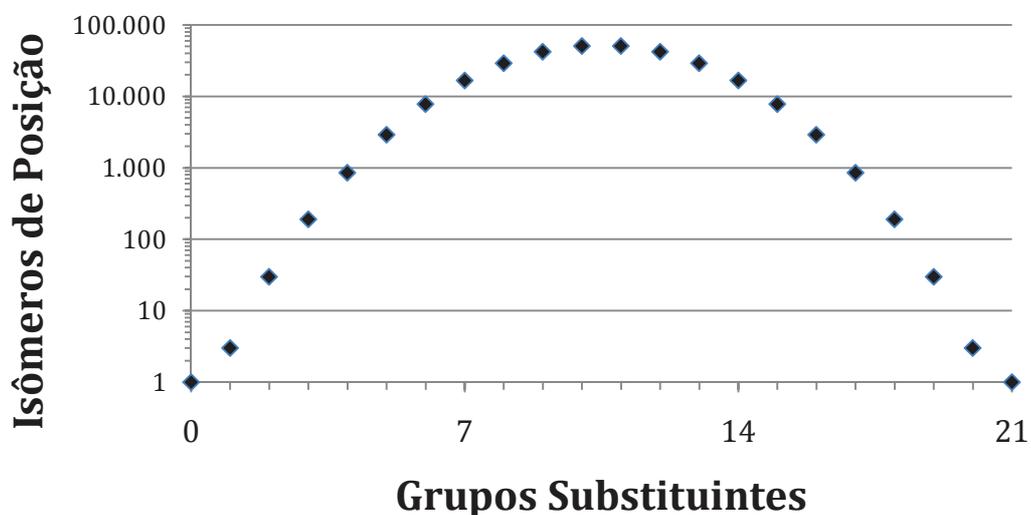
Com base nos estudos de modelagem molecular realizados com derivados de CDs, foi possível observar que a definição de um modelo *in silico* adequado para representar os derivados de CDs é uma tarefa desafiadora, uma vez que o número de possibilidades de isômeros de posição é muito grande.

É possível estimar a quantidade de possibilidades para substituição multiplicando-se o número de possíveis posições para substituição em uma unidade de glicopiranosose (três grupos hidroxila: OH(2), OH(3) e OH(6)), pelo número de unidades de glicopiranosose. Já o número de possíveis configurações é calculado a partir da equação de combinação (**equação 12**) dividido pelo número de unidades de glicose. Nesta equação,  $n$  é a quantidade de possíveis posições para substituição, e  $p$  é a quantidade de grupos substituintes. O número total de combinações precisa ser dividido pelo número de unidades de glicopiranososes, devido à simetria circular das CDs. O número de isômeros de posição aumenta rapidamente com a adição de cada grupo substituinte, como pode ser observado na **Figura 11**.

$$C = \frac{n!}{p!(n-p)!} \quad (12)$$

No caso da  $\beta$ -CD, o número máximo de isômeros de posição (50.388) é alcançado substituindo-se metade dos grupos hidroxila disponíveis. Assim, a probabilidade de sintetizar e isolar um produto uniforme diminui com o aumento do número de isômeros (Wenz, 1994).

**Figura 11:** Quantidade de isômeros de posição em função do número de grupos substituintes na  $\beta$ -CD. É importante ressaltar a escala logarítmica no eixo vertical.



Devido à dificuldade computacional de se gerar um modelo *in silico* com um conjunto de estruturas representativas, vários trabalhos na literatura utilizam modelos de derivados de CD com apenas uma estrutura para definir o modelo do derivado de CD (Aicart and Junquera, 2003; Bikádi *et al.*, 2006; Illapakurthy *et al.*, 2003; Junquera, Martin-Pastor and Aicart, 1998; Miletic *et al.*, 2013; Sapino *et al.*, 2008; Seyedi *et al.*, 2011). Alguns deles levam em consideração a razão de MS descrita na síntese do derivado para construir as estruturas (Illapakurthy *et al.*, 2003; Junquera, Martin-Pastor and Aicart, 1998; Liu *et al.*, 2003; Miletic *et al.*, 2013; Mura *et al.*, 1995), enquanto outros não mencionam como foram definidas as posições de substituição.

É importante lembrar dois pontos da sessão 2.2.2 (Derivados de Ciclodextrinas), que tratam do processo de síntese dos derivados de CDs: i) Obtenção de derivados homólogos com menor e maior razão de MS; ii) Preferência reacional por grupos hidroxila específicos. Estas questões, além dos isômeros de posição, tornam ainda mais desafiadora a definição de um modelo *in silico* apropriado para os cálculos de modelagem molecular.

O nosso grupo de pesquisa tem colaborado com grupos experimentais, auxiliando na elucidação das interações intermoleculares que justifiquem a formação dos complexos de inclusão de fármacos (ou candidatos a fármacos) com derivados de CDs.

Foram publicados dois trabalhos na área, sendo um deles o estudo do encapsulamento da  $\beta$ -lapachona na HP- $\beta$ -CD. A estrutura da HP- $\beta$ -CD foi construída a partir da estrutura tridimensional da  $\beta$ -CD (Saenger *et al.*, 1998). Foi considerado o grau de substituição do derivado de 0,7 unidades de HP por unidade de glicose, o que indicou que a HP- $\beta$ -CD teria em média 5 unidades de HP, no total. Desta maneira, foram construídas estruturas com substituições em 5 diferentes pontos da  $\beta$ -CD. Depois disto, foi realizado o cálculo de *docking* utilizando-se o programa Gold (Jones *et al.*, 1997). Por fim, foi realizado o cálculo do valor da energia de interação intermolecular ( $\Delta E$ ) do complexo de inclusão, utilizando-se o método semi-empírico RM1, de química quântica (Cavalcanti *et al.*, 2011).

No segundo artigo, foi utilizada a mesma abordagem empregada anteriormente, porém foi também considerada a formação do complexo 2:1 (duas unidades de HP- $\beta$ -CD para uma unidade do ligante LPSF/AC04), além do complexo 1:1 (Mendonça *et al.*, 2012).

Estes dois trabalhos mostram a preocupação do nosso grupo de pesquisa em focar dois aspectos nos estudos *in silico* envolvendo complexos de inclusão com derivados de CDs: i) Levar em consideração a variabilidade nas posições de substituição dos derivados de CDs utilizados experimentalmente, simulando de forma mais fidedigna o encapsulamento; ii) Realizar o refinamento dos resultados de *docking*, utilizando métodos semi-empíricos para calcular a energia de interação intermolecular ( $\Delta E$ ), por exemplo.

Essa abordagem que foi aplicada é bastante trabalhosa, pelo fato de envolver várias etapas de cálculo e utilizar diversos programas diferentes. Portanto, uma iniciativa de automatização desta metodologia aplicada aos complexos de inclusão abreviaria bastante o tempo de realização de novos estudos de modelagem molecular para estes tipos de complexos. O presente trabalho de doutorado busca exatamente construir uma ferramenta computacional para automatizar esta metodologia *in silico* empregada nos estudos de inclusão em CDs, contribuindo, desta forma, para avanços na inovação terapêutica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Desenvolvimento de uma plataforma computacional (CycloMolder) capaz de realizar estudos *in silico* para complexos de inclusão com *hosts* (CDs e seus derivados) utilizados na inovação terapêutica, de forma automática e precisa.

#### 3.2 Específicos

- Desenvolver uma interface gráfica de usuário (GUI) para o programa CycloMolder, facilitando a interação com o usuário.
- Implementar um módulo (CycloGen) capaz de construir modelos *in silico* para representar os derivados de CD, levando em consideração os aspectos relevantes da síntese dos derivados, de forma estatisticamente significativa.
- Implementar um módulo (CycloDock) capaz realizar o estudo de *docking* entre *hosts* (CDs e seus derivados) e *guests* (fármacos ou candidatos).
- Implementar uma análise dos resultados do módulo CycloDock utilizando uma abordagem estatística, e apresentá-los na forma de gráficos.
- Testar a aplicação do programa CycloMolder, através da realização de estudos de caso com o fármaco itraconazol, contribuindo na elucidação das razões moleculares que levam à formação e estabilização dos complexos de inclusão *host:guest*.

## 4 CYCLOMOLDER

A principal contribuição desta tese de doutorado é a plataforma CycloMolder. Portanto os capítulos de metodologia e resultados e discussão foram condensados neste capítulo, onde foi adotada uma estrutura textual que facilitasse a apresentação da plataforma, por se tratar especificamente de um software desenvolvido e implementado.

O CycloMolder é uma plataforma para gerar modelos de CDs e seus derivados, e para avaliar a habilidade em formar complexos de inclusão (*host:guest*). Ela é composta por dois módulos internos, CycloGen e CycloDock, e está disponível para o sistema operacional Windows, apesar de também ter rodado, de forma bem sucedida, na plataforma Linux (Lubuntu, em particular, usada nos testes), via o lançador de programas Wine (<https://www.winehq.org>).

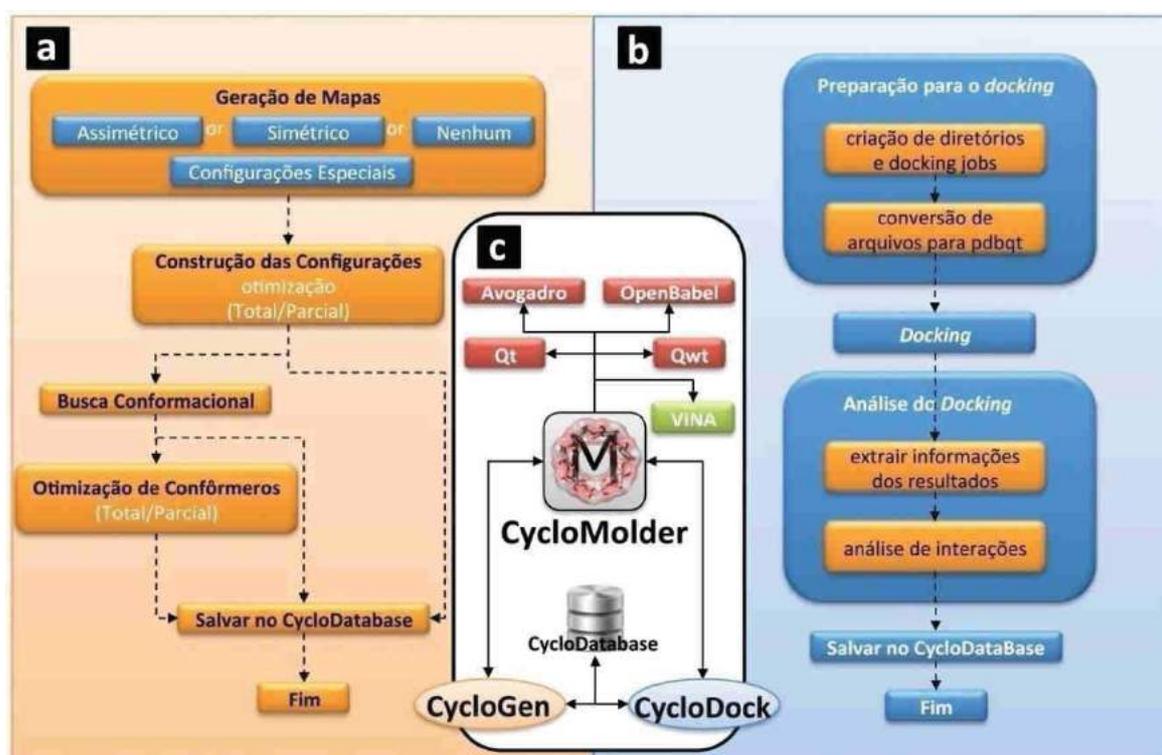
A metodologia automatizada e implementada na plataforma CycloMolder foi baseada em estudos prévios envolvendo o *host* SBE- $\beta$ -CD. Os estudos foram apresentados no texto de qualificação deste projeto de doutorado e no 3º Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica (EBIT 2013) no formato de pôster, disponível no **Apêndice D**. Esses estudos serviram para conhecer bem o sistema de interesse, e a demanda de programas e soluções computacionais necessários para a implementação da plataforma.

### 4.1 Implementação

A plataforma CycloMolder foi escrita com linguagem de programação C++, utilizando-se o framework QT (Qt, 2014) para criar uma aplicação nativa com uma GUI. Também foram utilizadas outras bibliotecas, a saber: Avogadro 1.1.1 (Hanwell *et al.*, 2012), OpenBabel 2.3.2 (O'Boyle, Banck, *et al.*, 2011; OpenBabel, 2013) e Qwt 6.1.2 (Rathmann and Wilgen, 2002), como pode ser observado na **Figura 12C**. Utilizando-se a biblioteca Avogadro, foi possível permitir a visualização em tempo real das estruturas para o usuário, como também foi possível auxiliar na construção dos grupos substituintes das CDs, e ainda dos *guests*. O OpenBabel foi usado para construir as configurações dos derivados de CD, otimizar as estruturas, realizar buscas conformacionais, e para conversão entre formatos de arquivos contendo estruturas moleculares. A

biblioteca Qt possui um framework para construção de gráficos bidimensionais, o que permite uma análise gráfica dos resultados obtidos para os complexos de inclusão. O programa Autodock Vina 1.1.2 (Trott and Olson, 2010) foi utilizado para realizar os cálculos de *docking* de *guests* flexíveis com seus *hosts* (CDs e seus derivados). As estruturas tridimensionais para  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD foram construídas a partir de dados bem conhecidos da literatura (Saenger *et al.*, 1998). Todos os arquivos e dados gerados são gerenciados utilizando-se arquivos XML (<http://www.w3.org/XML>). É importante destacar que todas as bibliotecas e programas utilizados para desenvolver essa plataforma são de código aberto (*open-source*), portanto esse software será disponibilizado gratuitamente para todos, assim como o seu código fonte.

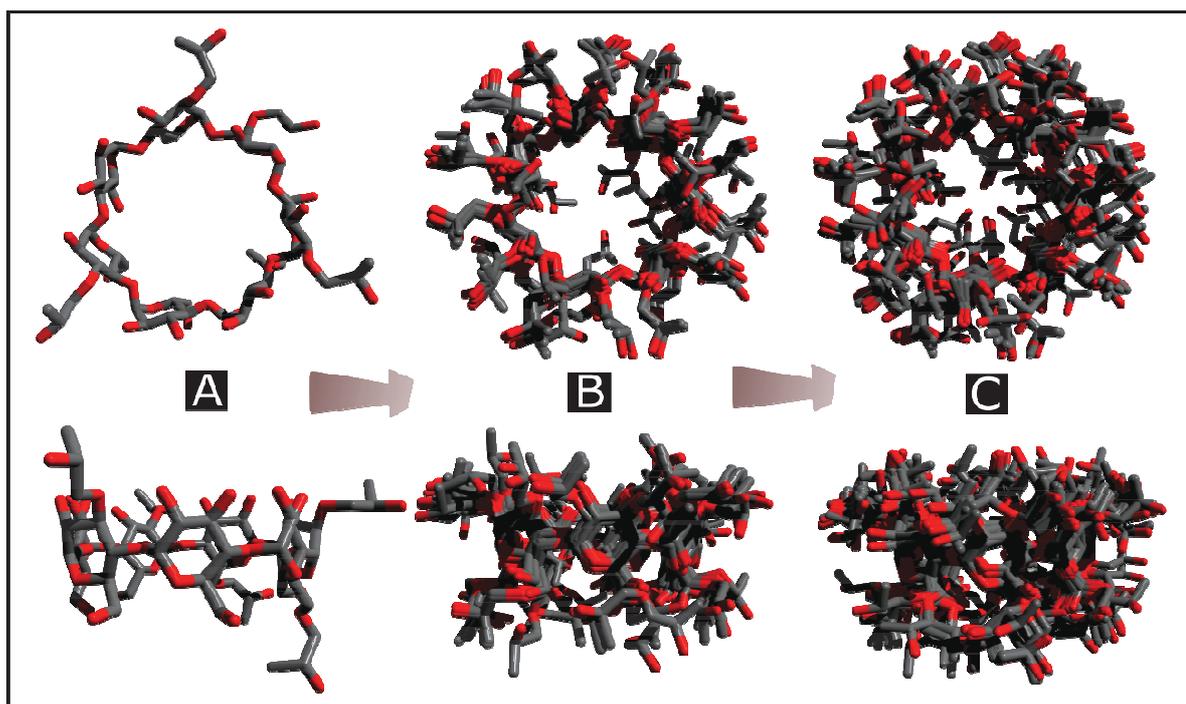
**Figura 12:** Fluxogramas operacionais dos módulos do CycloMolder e sua arquitetura geral. A) Fluxograma do módulo CycloGen; B) Fluxograma do módulo CycloDock; C) Arquitetura do CycloMolder, com retângulos vermelhos indicando a dependência de código, e retângulos verdes indicando a dependência de softwares externos.



## 4.2 CycloGen

O primeiro módulo, CycloGen, gera um conjunto de estruturas, a partir de um número desejado de configurações para derivados específicos de CDs, com o propósito de realizar uma representação estatisticamente das estruturas químicas viáveis, através de um modelo global. Ele também permite a realização de uma busca por isômeros conformacionais em cada configuração gerada, aumentando o conjunto de estruturas quimicamente representativas (ver **Figura 13**).

**Figura 13:** Estruturas do *host* HP- $\beta$ -CD, visão frontal (parte superior) e lateral (parte inferior). A) Uma única estrutura (configuração); B) Superposição de 20 estruturas (configurações); C) Superposição das 100 estruturas (20 configurações, com 5 conformações cada), obtidas após a busca conformacional.



De forma geral, as estruturas são divididas em configurações e conformações. As configurações podem ser homólogos estruturais, com diferentes razões de MS, ou apenas isômeros de posição com a mesma razão de MS. O fluxograma operacional do módulo CycloGen pode ser encontrado na **Figura 12A**.

### 4.2.1 CycloGen wizard

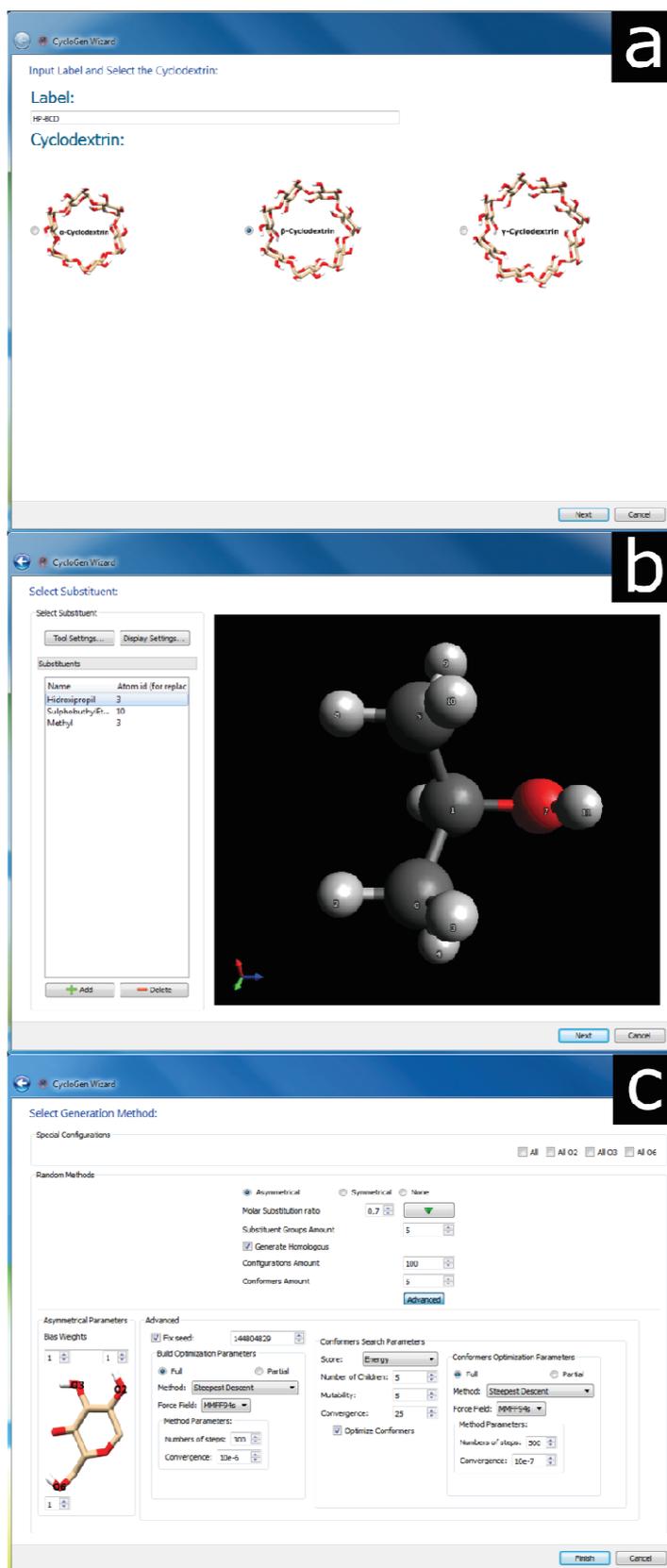
A definição dos parâmetros para construção do derivado de CD é realizada através do assistente (*wizard*) do módulo CycloGen, que orienta o usuário através de um processo passo a passo. Na primeira janela do *wizard* (ver **Figura 14A**) é possível selecionar a CD natural que vai servir como estrutura inicial para construção do modelo *in silico* que representa o derivado de CD desejado. Também é possível escolher o rótulo (*label*) para identificar o modelo de estruturas que será gerado, com o intuito de facilitar a reutilização deste modelo em cálculos futuros.

Na segunda página do *wizard* (ver **Figura 14B**), é possível selecionar o grupo substituinte correspondente ao derivado de CD que se deseja modelar. Também é possível criar novos grupos substituintes, sendo a construção do grupo substituinte realizada através da janela de visualização tridimensional do Avogadro, onde é possível desenhar a estrutura do grupo substituinte, e otimizá-la aplicando o campo de força MMFF94s. A posição de substituição, no grupo substituinte, é definida selecionando-se um átomo de hidrogênio na sua estrutura. Por exemplo, para criar um derivado metila ( $\text{CH}_3$ ) é necessário desenhar a estrutura do gás metano ( $\text{CH}_4$ ) e em seguida selecionar um dos átomos de hidrogênio. Este átomo será apagado juntamente com o átomo de hidrogênio da hidroxila substituída na CD, no momento da adição do grupo substituinte.

Na terceira e última página do *wizard* (ver **Figura 14C**), é possível definir os parâmetros para geração das estruturas que vão compor o modelo *in silico*. O usuário pode selecionar entre um dos dois métodos de geração aleatória de configurações (assimétrica ou simétrica), ou nenhum deles. A escolha por nenhum método de geração exige a escolha de pelo menos uma das configurações especiais disponíveis. A escolha de qualquer uma das configurações especiais (ou todas) também pode ser realizada juntamente com um dos métodos de geração aleatória.

Os métodos de geração aleatória constroem as configurações com base na quantidade de grupos substituintes por CD e na quantidade de configurações desejadas. Através da GUI, é possível converter a razão de MS (*MS ratio*) em quantidade de grupos substituintes por CD.

**Figura 14:** Telas do CycloGen Wizard. A) tela para seleção da CD; B) tela para seleção do grupo substituinte; C) tela para seleção do método de geração.



Uma vez que a síntese de derivados uniformes de CD é uma tarefa desafiadora, é muito comum que os derivados possuam estruturas homólogas.

Dessa forma, o CycloGen tem a opção de gerar estruturas homólogas. Estas estruturas podem possuir uma menor e maior razão de MS, quando comparadas com a razão de MS escolhida. O número de configurações, nesse caso, será sempre múltiplo de 4, onde metade das configurações vão ter a quantidade de grupos substituintes escolhidos ( $n$ ) e a outra metade será igualmente dividida entre configurações com  $(n-1)$  e  $(n+1)$  grupos substituintes, sempre respeitando a proporção 2:1:1, respectivamente.

A realização da busca conformacional é opcional, e para ativá-la é necessário selecionar uma quantidade de conformeros maior que 1. Nas opções avançadas (**Figura 14C**), é possível ajustar os parâmetros da busca conformacional, assim como também os parâmetros de otimização de geometria. Foi adicionada também a opção de manter a semente da geração de números pseudo-aleatórios fixa. Esses números pseudo-aleatórios são utilizados para determinar quais as posições (hidroxilas) que serão substituídas na CD. Portanto, é possível garantir que o processo de geração tenha reprodutibilidade, mantendo-se a semente dos números pseudo-aleatórios fixa.

#### 4.2.2 Geração de Mapas

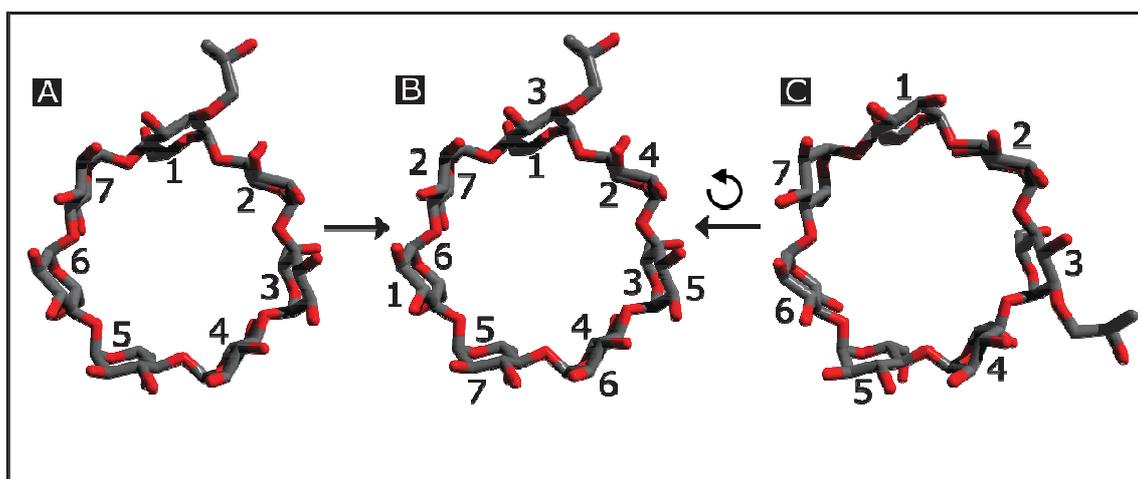
A identificação das posições de substituição nas CDs é feita através de mapas que indicam as hidroxilas que serão substituídas. Existem dois algoritmos aleatórios para criar um conjunto de mapas: o algoritmo de busca aleatória assimétrica e o algoritmo de busca aleatória simétrica.

Também é possível construir 4 mapas adicionais, com configurações especiais: i) heptakis(2,3,6-tri-O-substituinte)-CD, com todas as posições substituídas; ii) heptakis(2-mono-O-substituinte)-CD com todas as posições OH(2) substituídas; iii) heptakis(3-mono-O-substituinte)-CD, com todas as posições OH(3) substituídas; iv) heptakis(6-mono-O-substituinte)-CD, com todas as posições OH(6) substituídas.

Durante a construção dos mapas aleatórios para cada modelo, houve a preocupação de gerar sempre mapas diferentes uns dos outros, ou seja, mapas que representam configurações únicas (distintas). Isso foi possível através da implementação de um algoritmo que compara cada mapa recém gerado com os mapas anteriores. O algoritmo verifica se o mapa é igual a algum dos mapas anteriores. Devido à simetria circular das CDs, a cada etapa

de comparação um dos mapas sofre um número de rotações, e a cada rotação os mapas são comparados. O número de rotações realizadas é  $n-1$ , onde  $n$  é a quantidade de unidades de glicopiranoses do derivado de CD. Por exemplo, comparando-se dois mapas, sendo um com apenas uma substituição na posição OH(2) da unidade 1 de glicopiranse, e o outro mapa com apenas uma substituição na posição OH(2) na unidade 3, observa-se que eles são iguais, e o algoritmo os identifica como tal, como pode ser observado na ilustração da **Figura 15**.

**Figura 15:** Ilustração do algoritmo para detectar mapas iguais com o derivado HP- $\beta$ -CD. Em A, uma configuração com substituição na posição OH(2) da unidade 1, em C, outra configuração com substituição na posição OH(2) da unidade 3. Em B, as configurações A e C são sobrepostas, onde a configuração C sofreu uma rotação anti-horária de 2 unidades de glicopiranoses.



#### 4.2.2.1 Geração Aleatória Assimétrica

O método de geração aleatória assimétrica utiliza dois números pseudo-aleatórios para definir cada ponto de substituição, sendo um para selecionar a unidade de glicopiranosose, e o outro para selecionar uma das três posições para substituição (OH(2), OH(3) e OH(6)) na unidade de glicopiranosose.

Neste método, é possível levar em consideração a questão da regioseletividade da síntese dos derivados, alterando-se os pesos das posições de substituição nas unidades de glicopiranosose durante a construção

dos modelos. Dessa forma, é possível criar uma tendência (preferência) na escolha pela posição de substituição dentro de uma unidade de glicopiranosose. Por exemplo, se todos os pesos tiverem o mesmo valor (1, por exemplo), cada posição terá 33,33% de probabilidade de ser substituída. Por outro lado, se for atribuído o valor 2 para o peso da posição OH(2) enquanto os outros (OH(3) e OH(6)) tiverem valor igual a 1, a posição OH(2) terá 50% de probabilidade de ser substituída, e as outras posições terão probabilidade de 25% cada.

Os limites de quantidade de configurações para o método assimétrico foram definidos de acordo com o gráfico da **Figura 11**, que mostra a quantidade de isômeros de posição em função do número de grupos substituintes.

#### 4.2.2.2 Geração Aleatória Simétrica

A geração aleatória simétrica utiliza apenas um número pseudo-aleatório para selecionar a posição de substituição na unidade de glicopiranosose. A seleção das unidades de glicopiranososes a serem substituídas é realizada por um algoritmo que maximiza a distância entre os grupos substituintes, levando em consideração a estrutura simétrica e cíclica das CDs. Por exemplo, se uma configuração de um derivado de  $\alpha$ -CD será gerado com 3 grupos substituintes, 3 unidades de glicopiranosose terão um grupo substituído cada, separados um do outro por uma unidade de glicopiranosose sem grupos substituídos. Em outras palavras, como a  $\alpha$ -CD possui 6 unidades de glicopiranosose, apenas as unidades 1, 3 e 5 vão receber grupos substituintes, enquanto as unidades 2, 4 e 6 permanecerão sem substituições.

Todas as possibilidades de substituições foram agrupadas em 5 tipos:

##### **Tipo 1: Uniforme**

Quando a quantidade de grupos substituintes é proporcional à quantidade de unidades de glicopiranosose. Nesse caso cada unidade de glicopiranosose recebe a mesma quantidade de grupos substituinte.

Ex:  $\alpha$ -CD com 12 grupos substituintes, onde cada unidade recebe 2 grupos.

**Tipo 2: Uniforme com uma unidade diferente**

Quando todas as unidades recebem a mesma quantidade de grupos substituintes, com a exceção de uma unidade.

Ex:  $\alpha$ -CD com 13 grupos substituintes, onde cada unidade de glicopirranose recebe 2 grupos, com a exceção de uma, que terá as 3 posições substituídas.

**Tipo 3: Salto simples (Alternada)**

Quando as diferenças nas quantidades de substituições acontecem saltando uma unidade de glicopirranose.

Ex:  $\alpha$ -CD com 9 grupos substituintes, as unidades 1, 3 e 5 recebem 2 grupos substituintes, enquanto as unidades 2, 4 e 6 recebem apenas 1 grupo.

**Tipo 4: Salto duplo**

Quando as diferenças nas quantidades de substituições acontecem saltando duas unidades de glicopirranose.

Ex:  $\alpha$ -CD com 8 grupos substituintes, as unidades 1 e 4 recebem 2 grupos substituintes, enquanto as unidades 2, 3, 5 e 6 recebem apenas 1 grupo.

**Tipo 5: Salto triplo**

Quando as diferenças nas quantidades de substituições acontecem saltando três unidades de glicopirranose.

Ex:  $\gamma$ -CD com 10 grupos substituintes, as unidades 1 e 5 recebem 2 grupos substituintes, enquanto as unidades 2, 3, 4, 6 e 7 recebem apenas 1 grupo.

A geração de estruturas simétricas limita a quantidade de possíveis configurações, portanto é possível gerar apenas um número bem menor que a quantidade máxima de isômeros de posição. Desta forma, foi definido um valor máximo de 100 configurações para a geração simétrica. No entanto, em alguns casos, os valores de quantidade de grupos substituintes permitem gerar apenas uma quantidade de configurações inferior a 100. Para determinar os limites reais desses casos, foi realizada uma busca exaustiva por configurações em cada um deles. Os limites podem ser vistos na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Limites de configurações para o método de geração aleatória simétrica.

Qtd. Grupos Substituintes	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
2	6	9	6
3	11	27	27
4	45	81	24
5-13	100	100	100
14	45	100	100
15	11	100	100
16	6	100	100
17	-	81	100
18	-	27	100
19	-	9	100
20	-	-	24
21	-	-	27
22	-	-	6

#### 4.2.3 Construção das Configurações

Depois da etapa de geração dos mapas de substituição, as configurações são construídas, de fato. A biblioteca OpenBabel foi utilizada para efetuar a substituição das hidroxilas (das CDs originais) pelos grupos substituintes. Antes de fazer a conexão, propriamente dita, são removidos os átomos de hidrogênio do substituinte (selecionado na construção do substituinte) e da hidroxila (determinado pelo mapa de substituição). Em seguida as duas moléculas são unidas por uma ligação simples entre os átomos diretamente ligados a estes átomos de hidrogênio que foram removidos. Esse processo se repete até que todas as posições indicadas no mapa sejam substituídas.

Houve a preocupação de otimizar quimicamente a estrutura, após cada grupo substituinte ser adicionado a CD. Dessa forma, após cada incremento estrutural, uma etapa de otimização de geometria é realizada. Todo o processo

de incremento estrutural e otimização se repete até que todos os mapas sejam construídos.

#### 4.2.4 Otimização

O processo de otimização de geometria pode ser total, onde todos os átomos são otimizados, ou parcial, onde apenas os átomos de hidrogênios das hidroxilas e os grupos substituintes adicionados são otimizados. Alguns métodos estão disponíveis para realizar a otimização, tais como: i) *Steepest Descent*, ii) Gradientes Conjugados e iii) Dinâmica Molecular.

Os métodos de otimização podem aplicar os campos de força MMFF94, MMFF94s, UFF e GAFF. O campo de força de escolha para os métodos de mecânica molecular (*steepest descent* e gradientes conjugados) é o MMFF94s, seguido do UFF quando não for possível utilizar o MMFF94s. Como já foi citado anteriormente, essa preferência existe devido ao fato das implementações destes campos de força terem sido otimizadas (no OpenBabel) para obter uma maior eficiência na minimização de energia. É possível definir o número de passos do algoritmo de otimização, assim como também o critério de convergência do algoritmo.

Para realizar a modelagem aplicando-se dinâmica molecular, é aconselhado o uso do campo de força MMFF94, seguido pelo UFF, pelos mesmos motivos já citados. É possível escolher a temperatura do processo de dinâmica (300K, 600K ou 900K), lembrando que a temperatura precisa ser suficientemente alta para poder alcançar a conformação com energia mínima global, porém não tão alta a ponto de distorcer a estrutura da molécula.

O processo de otimização é realizado obrigatoriamente a cada etapa de incremento na construção das configurações, para garantir a formação de uma estrutura quimicamente viável. A otimização de geometria das conformações geradas após a busca conformacional é opcional, ficando a critério do usuário a sua realização. Muito embora seja aconselhado o processo de otimização de geometria também nessa etapa, obviamente há um custo adicional de demanda computacional envolvido.

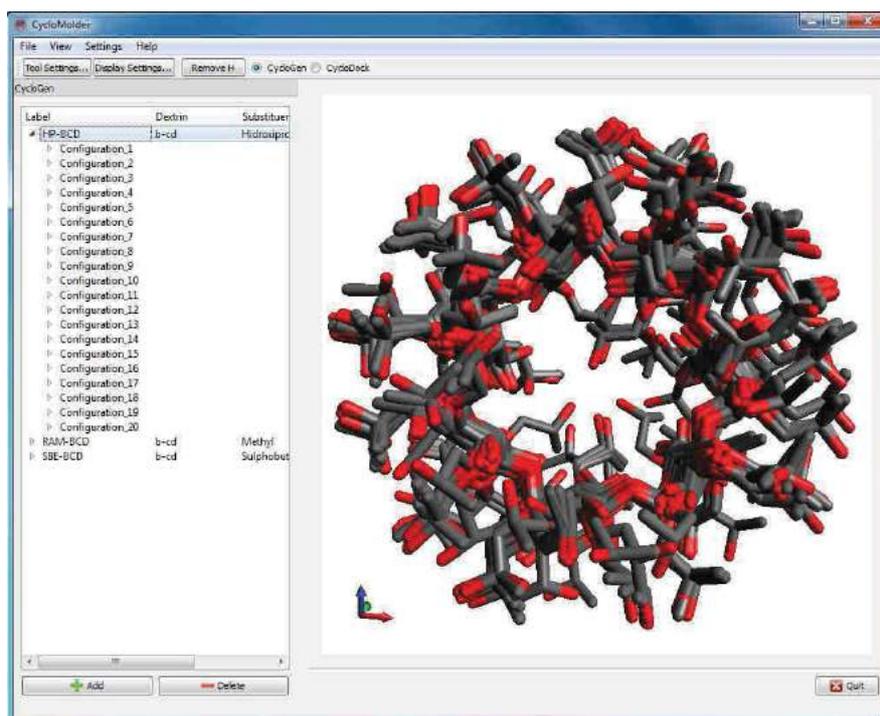
#### 4.2.5 Busca Conformacional

É possível realizar a busca conformacional nas configurações construídas, gerando-se várias conformações para cada configuração. A busca é baseada em algoritmo genético e a função de pontuação pode ser baseada em Energia ou em RMSD. A função de pontuação baseada em Energia busca por confôrmeros mais estáveis, enquanto a função de pontuação baseada em RMSD busca por um conjunto mais diversificado de confôrmeros. Todas as conformações também podem ser otimizadas na sequência, como mencionado anteriormente.

Os parâmetros *children*, *mutability* e *convergence* ajustam o algoritmo genético. A cada geração do algoritmo genético, para cada conformação, a quantidade de "filhos" criada é definida pelo valor de *children*. O parâmetro *mutability* determina a frequência de ocorrência de uma permutação na criação da próxima geração. Já o parâmetro *convergence* é a quantidade de gerações idênticas que precisam ser geradas para que o processo de busca chegue ao fim.

As estruturas geradas podem ser visualizadas na janela principal da GUI, individualmente ou conjuntamente sobrepostas, como pode ser observado na **Figura 16**.

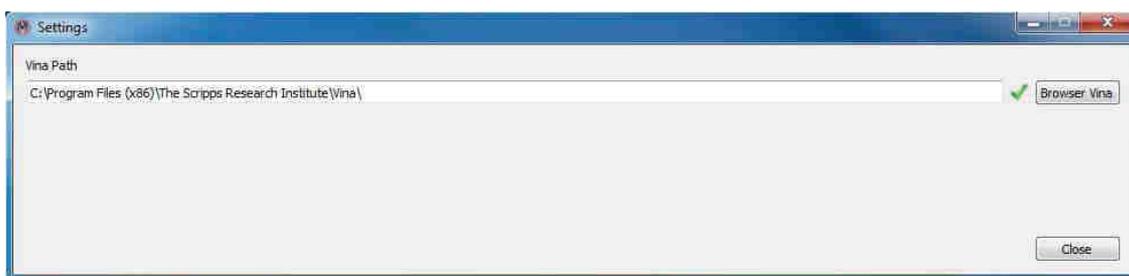
**Figura 16:** Janela principal do módulo CycloGen.



### 4.3 CycloDock

No módulo CycloDock, um programa externo de *docking* (Autodock Vina) é utilizado para realizar os cálculos de *docking* molecular entre *hosts* (CDs e derivados) e *guests* (moléculas ou candidatos a fármacos em potencial, por exemplo). Portanto, é necessário indicar para o CycloMolder onde o arquivo executável do programa Autodock Vina está localizado no computador. O módulo CycloMolder procura no caminho padrão de instalação ( C:\Program Files(x86)\The Scripps Research Institute\Vina ), e caso o executável esteja nesse diretório, o botão para iniciar a preparação para os cálculos de *docking* é habilitado na interface do CycloMolder. Caso não esteja, é necessário apontar o local do executável através da janela de ajustes (**Figura 17**).

**Figura 17:** Janela de ajustes do CycloMolder.



Este módulo pode ser utilizado para avaliar quantitativamente a habilidade das CDs e seus derivados em formar complexos de inclusão *host:guest*. Esse tipo de estudo pode ser utilizado como um guia para auxiliar na escolha de qual host utilizar nos estudos experimentais, particularmente na área de tecnologia farmacêutica, e também descrever as interações intermoleculares que justificam a formação e a estabilidade relativa dos complexos de inclusão mais promissores.

Um repositório de dados denominado CycloDatabase gerencia todos os arquivos e dados gerados por ambos os módulos (CycloGen e CycloDock).

#### 4.3.1 CycloDock Wizard

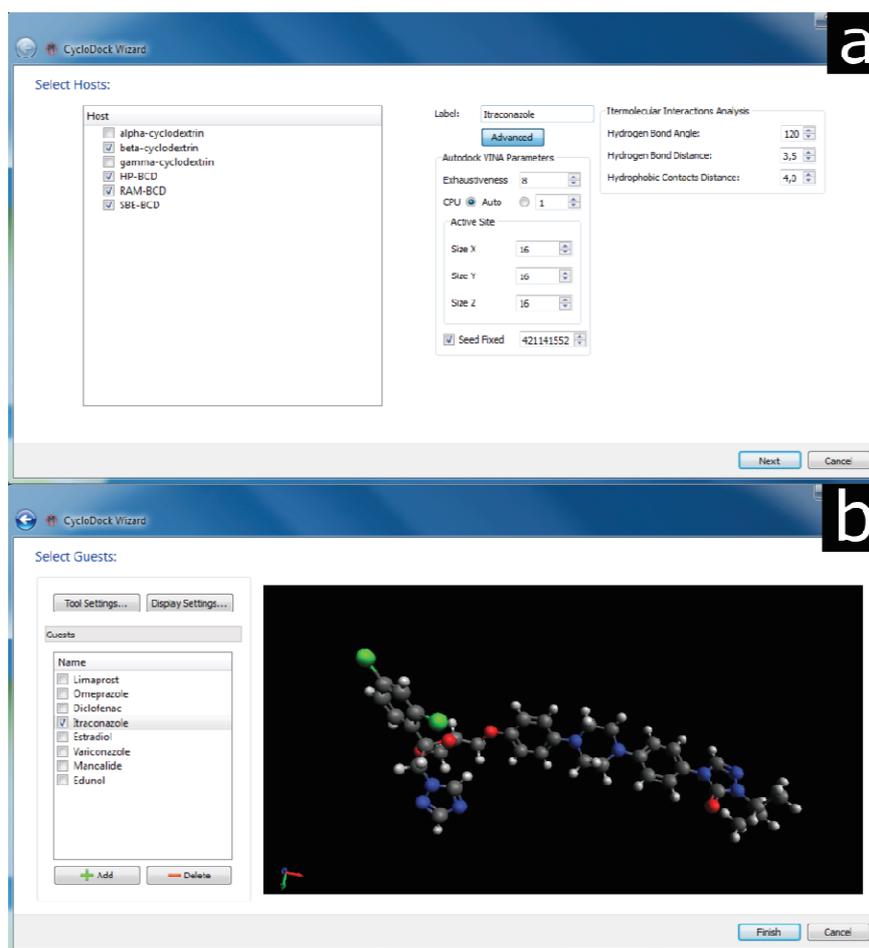
A definição dos parâmetros para a realização dos cálculos de *docking* é feita através do *wizard* do módulo CycloDock. Na primeira tela do *wizard* (**Figura 18A**), é possível selecionar o(s) *host(s)* que serão utilizados no cálculo de

*docking*, dentre eles também as três CDs naturais, e os derivados gerados a partir delas. Nas opções avançadas encontradas nesta tela, é possível ajustar os parâmetros do programa Autodock Vina. Dentre eles, o parâmetro *exhaustiveness* (relacionado com a robustez, ou exaustão, da busca por soluções de *docking*), a quantidade de núcleos (*cores*) a ser utilizada no cálculo, o tamanho da caixa do sítio ativo e, por último, a possibilidade de fixar a semente do gerador de números pseudo-aleatórios.

Nesta janela, também podem ser ajustados os parâmetros para realizar a análise de interações intermoleculares entre *host* e *guest*. Dentre eles, o ângulo e a distância das ligações de hidrogênio e a distância dos contatos hidrofóbicos.

A segunda e última janela (**Figura 18B**) é destinada à seleção do(s) *guest(s)*. Existe a possibilidade de adicionar um novo *guest* através da janela de visualização tridimensional do Avogadro, onde é possível desenhar a estrutura do *guest*, ou carregá-lo a partir de um arquivo no formato SDF (bastante comum entre os bancos de dados de estruturas moleculares). Também é possível realizar a otimização de geometria do *guest*, aplicando o campo de força MMFF94s, antes dele ser utilizado no cálculo de *docking*.

**Figura 18:** Telas do CycloDock wizard. A) tela para seleção do(s) *host(s)*; B) tela para seleção do(s) *guest(s)*.



#### 4.3.2 Cálculo de *docking* molecular

Uma vez que é utilizado um programa externo para esta tarefa, é necessário organizar os arquivos de entrada e de saída em diretórios, e preparar os *DockingJobs* (unidades internas de configuração no módulo CycloDock), contendo as informações necessárias para executar os cálculos de *docking* antes de realizar os cálculos. O programa Autodock Vina exige que os arquivos de entrada das estruturas moleculares (*hosts* e *guests*) estejam no formato PDBT. As conversões de formatos de arquivos são realizadas internamente através da aplicação da biblioteca OpenBabel. Após toda a preparação, os cálculos de *docking* podem ser realizados.

Os cálculos de *docking* são realizados entre todos os *hosts* e *guests* selecionados (N:N), lembrando que se o *host* possuir mais de uma estrutura (configurações e conformações, no caso dos derivados de CDs), será realizado um cálculo de *docking* com cada *guest*, para cada estrutura do *host*.

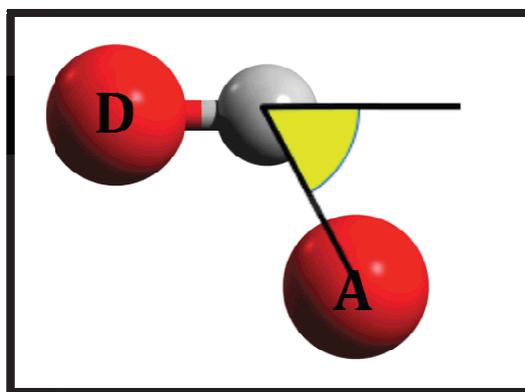
Depois dos cálculos de *docking* molecular, são selecionados como soluções os resultados com maior afinidade de ligação (valores mais negativos de energia de ligação), para cada resultado de *docking*. Dessa forma teremos apenas uma solução de *docking* para cada combinação entre *guest* e conformação do *host*. No caso do cálculo de *docking* envolvendo uma CD natural, será obtida apenas uma solução, pois apenas uma estrutura representa cada uma delas ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD).

Os resultados (estruturas moleculares e a energia de ligação do complexo de inclusão) são extraídos a partir dos arquivos de saída gerados pelo programa Autodock Vina. Em seguida, é realizada uma análise das interações intermoleculares, equivalente à realizada pelo algoritmo do programa BINANA (*Binding Analyzer Interaction*) (Durrant and McCammon, 2011).

Para um contato hidrofóbico ser considerado, basta que dois átomos de carbono (um do *host* e outro do *guest*) estejam a uma distância menor do que o limite definido na janela do *wizard* do CycloDock.

Já no caso das ligações de hidrogênio (LH), os átomos de oxigênio e nitrogênio (um do *host* e outro do *guest*), sendo um doador e o outro aceitador de LH, precisam estar a uma distância menor do que o limite e pelo menos um desses átomos precisa estar ligado a um átomo de hidrogênio. Também é necessário respeitar o limite do ângulo formado por estes átomos, definido entre o plano da ligação Doador-Hidrogênio e o átomo Aceitador (**Figura 19**).

**Figura 19:** Representação de uma ligação de hidrogênio, com destaque para o ângulo da ligação.



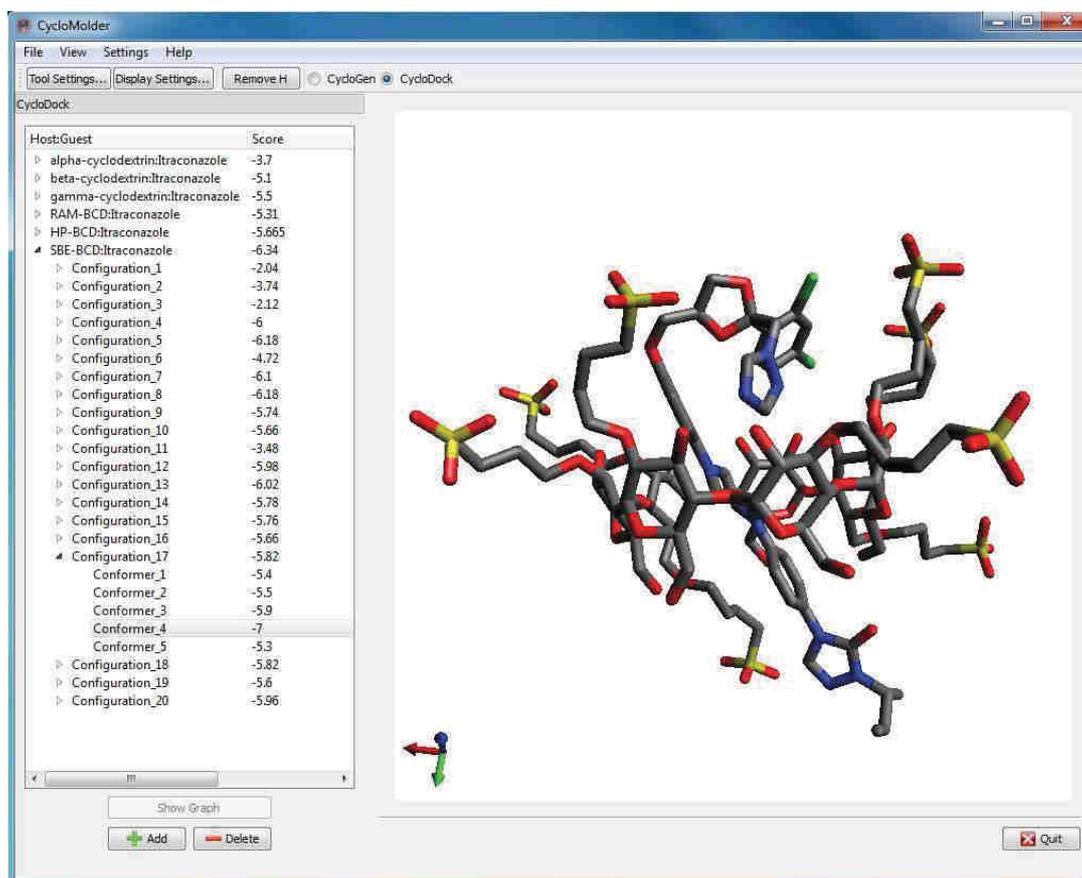
É importante chamar atenção para o fato de que o programa Autodock Vina não leva em consideração os graus de liberdade do alvo (*host*), ou seja, a estrutura é rígida durante o procedimento de *docking* molecular. Portanto, os átomos de hidrogênio polares (ligados às hidroxilas, por exemplo) do *host* não estão otimizados para formar ligações de hidrogênio com o *guest*, sendo necessário definir um limite angular menos restritivo para que a análise encontre as ligações de hidrogênio com significado químico pertinente.

O programa CycloMolder armazena todas as informações a respeito dos resultados de *docking* no repositório CycloDatabase, assim como todas as informações geradas durante a execução do programa. Essas informações são utilizadas para a realização de um tratamento estatístico dos resultados.

### 4.3.3 Resultados do CycloDock

Como no módulo CycloGen, os complexos de inclusão formados por cada conformação do(s) *host(s)* também podem ser visualizados na janela principal do módulo CycloDock (ver **Figura 20**).

**Figura 20:** Janela principal do módulo CycloDock.



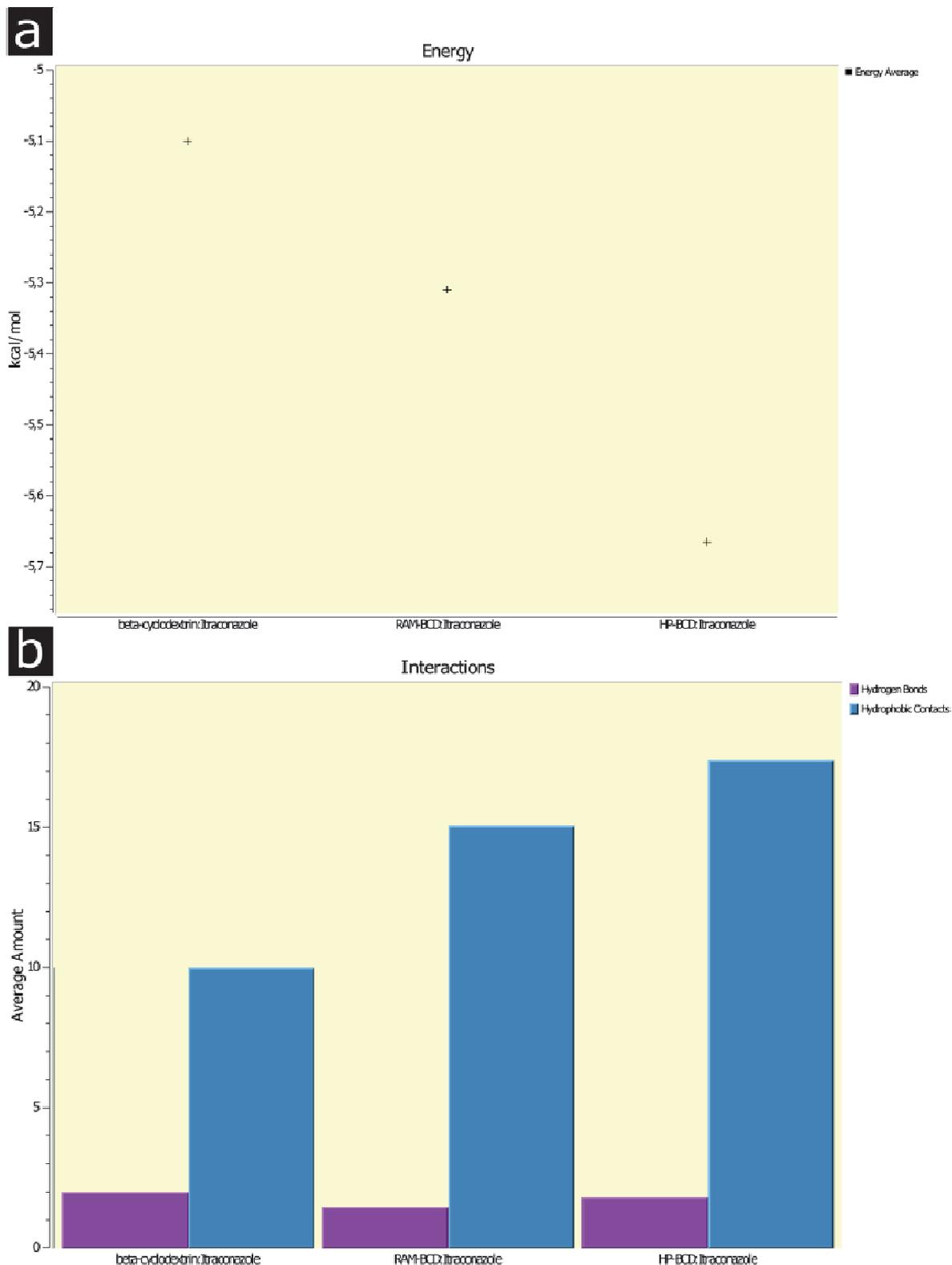
O potencial da análise de resultados do módulo CycloDock através de uma abordagem estatística será abordado através dos casos de uso.

#### 4.3.3.1 Casos de Uso

##### **Caso 1: Avaliação das energias de ligação da $\beta$ -CD, RAM- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD com a molécula itraconazol.**

Foram construídas 20 configurações para o derivado aleatoriamente metilado da  $\beta$ -CD (RAM- $\beta$ -CD) e para o derivado HP- $\beta$ -CD, onde cada configuração contém 5 conformações. A média das energias de ligação e as análises de interações intermoleculares para cada complexo podem ser encontradas na **Figura 21**. Por razões de comparação, a  $\beta$ -CD não substituída foi incluída como *host*. Os resultados sugerem que a HP- $\beta$ -CD é o derivado mais adequado para formar complexo de inclusão com a molécula itraconazol (fármaco antifúngico comercial), uma vez que o complexo formado com a HP- $\beta$ -CD apresenta, em média, a menor energia de ligação (-5,665 kcal/mol) e uma quantitativo maior de interações intermoleculares, 1,8 LH e 17,4 contato hidrofóbicos (CH). O complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol é aprovado e vendido nos EUA e na Europa, sob vias de administração oral e intravenosa pelo nome comercial Sporanox (Davis and Brewster, 2004).

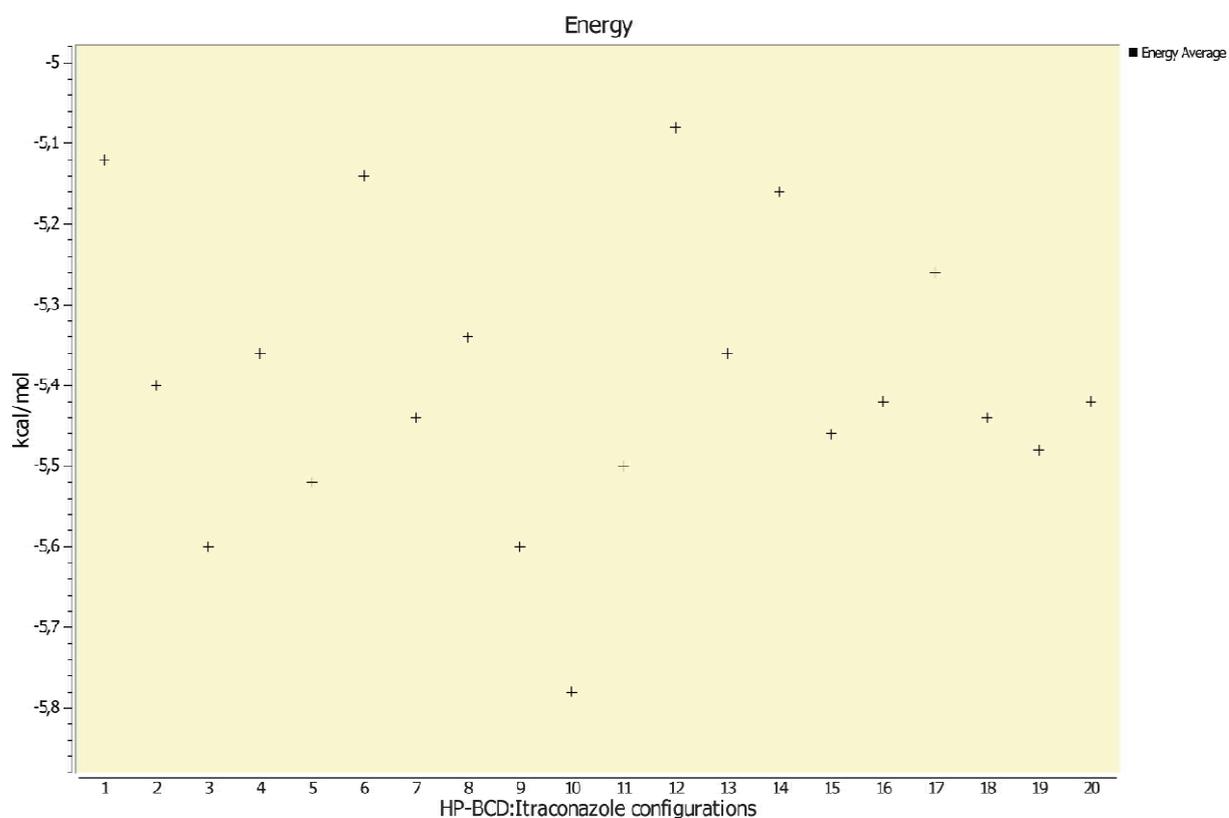
**Figura 21:** A) Média das energias de ligação para os complexos de inclusão da  $\beta$ -CD (-5,1 kcal/mol), RAM- $\beta$ -CD (-5,31 kcal/mol) e HP- $\beta$ -CD (-5,665 kcal/mol) com a molécula itraconazol. B) Médias das análises de interações intermoleculares para os complexos de inclusão da  $\beta$ -CD (2 LH e 10 CH), RAM- $\beta$ -CD (1,45 LH e 15,05 CH) e HP- $\beta$ -CD (1,8 LH e 17,4 CH) com a molécula itraconazol.



## Caso 2: Avaliação das energias de ligação entre várias configurações do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol.

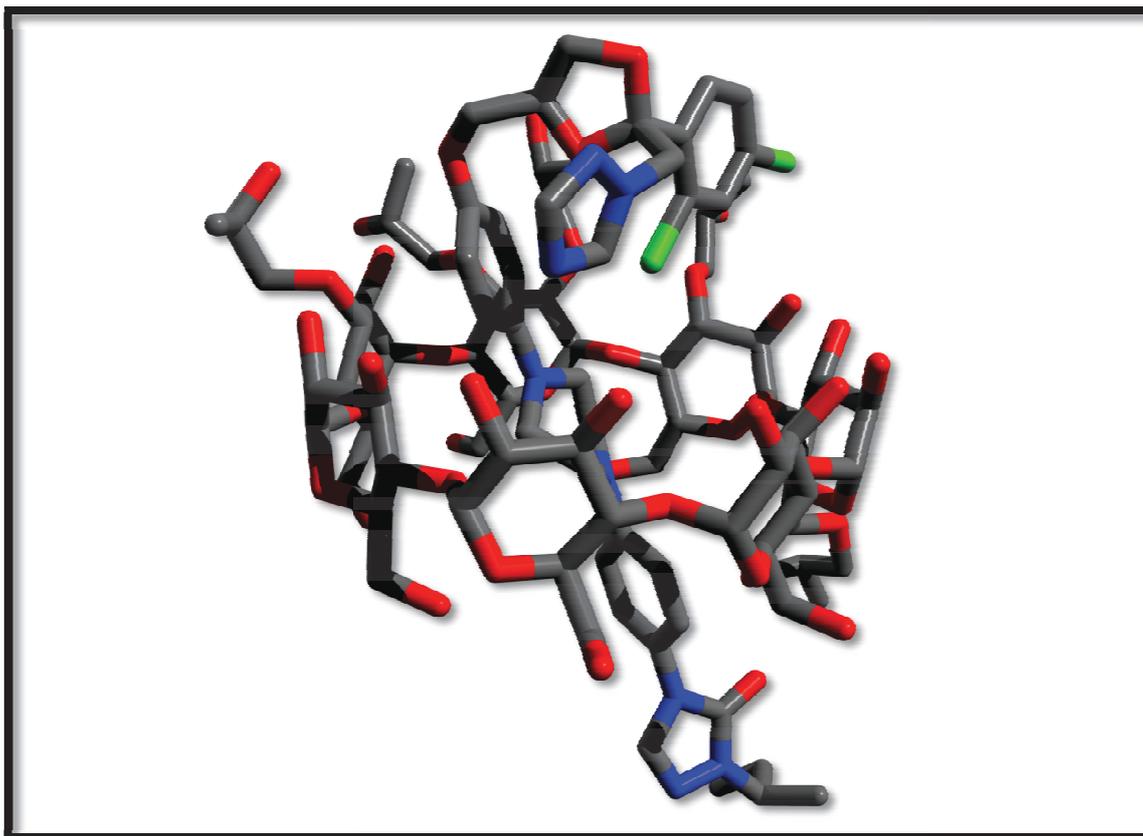
Foram construídas 20 configurações para o derivado HP- $\beta$ -CD, com 5 confôrmeros cada. As médias das energias de ligação dos confôrmeros, para cada configuração, podem ser observadas na **Figura 22**. Esses resultados mostram a distribuição dos valores de energia de ligação para todas as 20 configurações. A diferença entre a maior (#12) e a menor (#10) média é de cerca de 0,7 kcal/mol. Esta variação entre as médias das energias, para um mesmo derivado, mostra como pode ser baixa a representatividade de um modelo com apenas uma estrutura química para o *host*, e mostra também a demanda por um tratamento estatístico como o proposto neste estudo, através de uma abordagem que utiliza um conjunto de estruturas (*ensemble*) geradas com a ferramenta CycloMolder. É importante destacar que todos os gráficos apresentados nas figuras 21 e 22 são, de fato, telas do programa CycloMolder, visualizadas pelos usuários durante a análise dos resultados de *docking*.

**Figura 22:** Distribuição das médias de energias de ligação para várias configurações do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol.



O módulo CycloDock também identifica qual a solução mais estável para o complexo de inclusão formado. A solução mais estável foi determinada pela energia de ligação mais negativa (-6,1 kcal/mol), obtida com a conformação número 2 da configuração #10. A estrutura do complexo pode ser observada na **Figura 23**.

**Figura 23:** Melhor resultado de *docking* para o complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol.



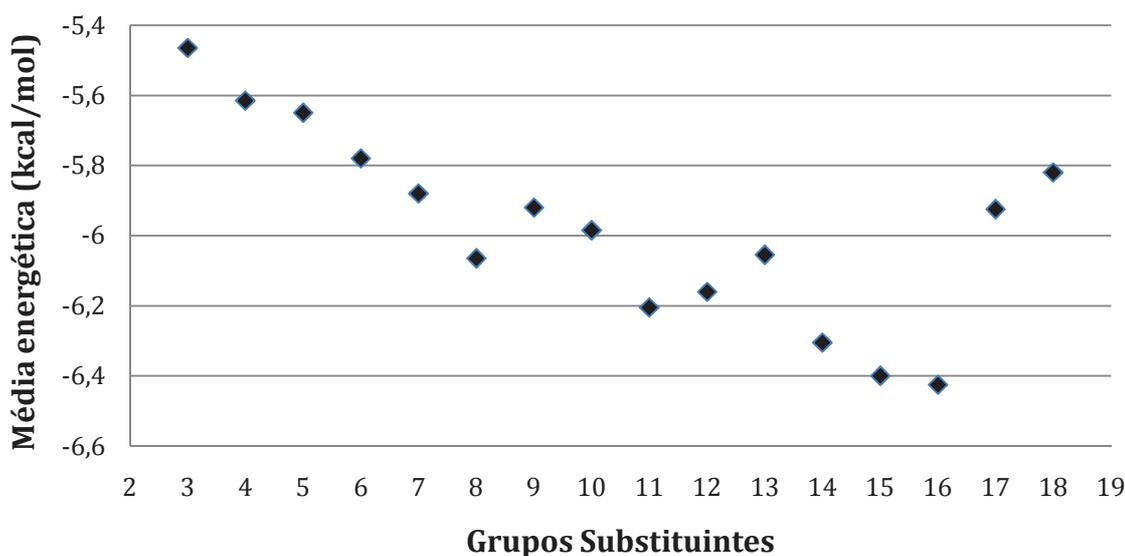
### **Caso 3: Avaliação do impacto dos grupos substituintes na energia de ligação do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol.**

Foram criados 16 modelos, cada um representando um homólogo diferente do derivado HP- $\beta$ -CD. Essas estruturas homólogas possuem diferentes números de grupos substituintes (ou diferentes *MS ratio*), variando de 3 a 18. A fim de representar cada modelo, 20 configurações foram construídas, com 5 conformações para cada.

Depois da avaliação das médias das energias de ligação para os 16

modelos complexados com a molécula itraconazol, foi possível identificar uma tendência, onde a média da energia de ligação aumenta (valores mais negativos), até o número de 16 grupos substituinte, e depois diminui bruscamente (valores menos negativos), como pode ser observado na **Figura 24**. Estes achados corroboram a importância de levar em consideração a razão de MS ao conduzir cálculos de modelagem molecular como este. Pode-se considerar o exemplo real de um fornecedor de derivados de CD (<http://sigmaaldrich.com>) que vende o derivado HP- $\beta$ -CD com diferentes razões de MS: 0,6, 0,8 e 1,0, que são convertidos para 4, 6 e 7 grupos substituintes por  $\beta$ -CD, respectivamente. Uma vez que derivados de CD com razões MS diferentes estão disponíveis comercialmente, a aplicação preditiva deste estudo de caso pode sugerir a razão de MS adequada para um *host* formar um complexo de inclusão *host:guest*.

**Figura 24:** Média das energias de ligação de várias estruturas homólogas do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD:itraconazol, formados por um número crescente de grupos substituintes.



## 5 CONCLUSÕES

A versão atual da plataforma CycloMolder já é capaz de realizar estudos *in silico* envolvendo complexos de inclusão com *hosts* (CDs e seus derivados) de forma automática e precisa, reduzindo o tempo de realização dos cálculos teóricos.

A plataforma CycloMolder procura facilitar os estudos de complexos de inclusão utilizando janelas *wizard* para a definição dos parâmetros necessários para a execução dos seus módulos (CycloGen e CycloDock), aumentando a interatividade com o usuário e tornando a GUI mais amigável e intuitiva.

O módulo CycloGen é capaz de construir modelos *in silico* de forma automatizada, levando em consideração variáveis importantes (incluindo informações experimentais do processo sintético destes derivados), como a geração de estruturas homólogas e a regioselectividade.

O módulo CycloDock automatiza todo o processo dos cálculos de *docking* molecular entre *hosts* (CDs e derivados) e *guests*. Dependendo da quantidade de estruturas dos derivados envolvidos, e da quantidade dos *guests* selecionados, o número total de cálculos de *docking* molecular pode chegar a centenas ou milhares, sendo assim uma abordagem impraticável de ser realizada sem automatização.

Os modelos de derivados de CD caracterizados por um conjunto (*ensemble*) de estruturas permitem levar em consideração o aspecto estatístico de representatividade envolvido na construção do modelo. A apresentação dos resultados do CycloDock na forma de gráficos possibilita a análise estatística detalhada entre vários complexos de inclusão formados, como foi mostrado nos casos de uso, demonstrando a importância de gerar um conjunto de estruturas para melhor representar os derivados de CD.

Os testes foram capazes de demonstrar a capacidade preditiva da plataforma em selecionar o *host* mais adequado para o *guest* de interesse (neste caso, o itraconazol), além da elucidação das razões intermoleculares que justificam a formação dos complexos de inclusão.

De forma geral, a plataforma CycloMolder atinge seus objetivos, automatizando e simplificando os estudos *in silico* com complexos de inclusão, particularmente utilizando ciclodextrinas e seus derivados como *hosts*. Assim, espera-se que esta ferramenta computacional possa dar contribuições significativas no âmbito da inovação terapêutica, particularmente para a área de pesquisa em tecnologia farmacêutica.

## 6 PERSPECTIVAS

Como esse trabalho se trata da implementação de um software, naturalmente existem diversas perspectivas. No âmbito da implementação, pretende-se criar um novo módulo capaz de realizar a otimização das estruturas dos complexos de inclusão obtidos após o *docking* molecular, através da aplicação de métodos semi-empíricos de química quântica. Já foi demonstrada a viabilidade da estratégia de se utilizar métodos semi-empíricos de química quântica para calcular a energia de interação intermolecular ( $\Delta E$ ) em outros trabalhos (Cavalcanti *et al.*, 2011; Mendonça *et al.*, 2012) do grupo de pesquisa, conforme foi descrito no final da sessão 2.3. Programas como o Mopac (Stewart, 2012), por exemplo, podem ser usados para calcular o  $\Delta E$  para os complexos de inclusão. A implementação destes refinamentos depois do *docking*, no programa CycloMolder, poderá agregar informações importantes em relação a formação dos complexos de inclusão, melhorando os resultados *in silico*. Também existe a perspectiva de considerar as diferentes estequiometrias dos complexos de inclusão *host:guest* nos cálculos teóricos, uma vez que, em alguns casos, outras proporções além de 1:1 também podem ser formadas.

Também existe a perspectiva de aplicar a metodologia implementada no programa CycloMolder frente a problemas experimentais reais. Podendo, assim, explorar a capacidade preditiva e explicativa desta plataforma *in silico* para complexos de inclusão.

No capítulo 8, de Apêndices, são apresentados os trabalhos publicados em colaboração com grupos experimentais durante este projeto de doutorado. No apêndice também consta um trabalho apresentado no terceiro Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica (EBIT), e o artigo submetido a revista indexada diretamente ligado a esta tese de doutorado.

## 7 REFERÊNCIAS

AICART, E.; JUNQUERA, E. Complex Formation between Purine Derivatives and Cyclodextrins: A Fluorescence Spectroscopy Study. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 47, n. 3/4, p. 161–165, 2003.

ALLINGER, N. L.; YUH, Y. H.; LII, J. H. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 23, p. 8551–8566, 1989.

ANSELMINI, C. *et al.* Analytical characterization of a ferulic acid/gamma-cyclodextrin inclusion complex. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, n. 4, p. 875–81, 2006.

ARAUJO, D. R. DE *et al.* Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 33, n. 1, p. 60–71, 2008.

ARAÚJO, M. V. G. DE *et al.* Sulfadiazine/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5788–94, 2008.

ARUN, R.; ASHOK, K. C. K.; SRAVANTHI, V. V. N. S. S. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 567–598, 2008.

BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BIKÁDI, Z. *et al.* Aggregation of cyclodextrins as an important factor to determine their complexation behavior. **Chemistry & biodiversity**, v. 3, n. 11, p. 1266–78, 2006.

**Biopharmaceutical Research Industry Profile**. Washington, DC, 2013.

BOONYARATTANAKALIN, K. S.; WOLSCHANN, P.; LAWTRAKUL, L. Molecular dynamics of  $\beta$ -CD in water/co-solvent mixtures. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, n. 3-4, p. 279–290, 2011.

BUSCHMANN, H. *et al.* New Textile Applications of Cyclodextrins. **Journal Of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry**, n. E 459, p. 169–172, 2001.

**CAChe**. ChibaFUJITSU, , 2000. Disponível em: <<http://www.ch.ic.ac.uk/local/organic/medchem/UserGuide.pdf>>

CARLOTTI, M. E. *et al.* On the complexation of quercetin with methyl- $\beta$ -cyclodextrin: photostability and antioxidant studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, n. 1-2, p. 81–90, 2010.

CARVALHO, I. *et al.* Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.

CASEWIT, C. J.; COLWELL, K. S.; RAPPE, A. K. Application of a universal force field to organic molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 2, p. 10035–10046, 1992.

CAVALCANTI, I. M. F. *et al.* The encapsulation of  $\beta$ -lapachone in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European journal of pharmaceutical sciences**, 2011.

CHALLA, R. *et al.* Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. E329–E357, 2005.

DANDAWATE, P. R. *et al.* Inclusion Complex of Novel Curcumin Analogue CDF and  $\beta$ -Cyclodextrin ( 1 : 2 ) and Its Enhanced In Vivo Anticancer Activity Against Pancreatic Cancer. **Pharmaceutical Research**, p. 1775–1786, 2012.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. December, p. 1023–1035, 2004.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 29, n. 6, p. 888–93, 2011.

ENGLER, E. M.; ANDOSE, J. D.; SCHLEYER, P. V. R. Critical Evaluation of Molecular Mechanics. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 95, p. 8005, 1973.

FORTES, A. C. *et al.* Anxiolytic properties of new chemical entity, 5TIO1. **Neurochemical research**, v. 38, n. 4, p. 726–31, 2013.

FRISCH, M. J. *et al.* **Gaussian 03, Revision B.01**PittsburghGaussian, Inc.

FRISCH, M. J. *et al.* **Gaussian**Wallingford CTGaussian, Inc., 2009.

GELDENHUYS, W. J. *et al.* Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 11, n. 3-4, p. 127–32, 2006.

#### **GNU General Public License v 2.0.**

GÓRNAS, P. *et al.* Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 190–196, 2009.

HALGREN, T. A. Merck Molecular Force Field. **J. Comput. Chem.**, v. 17, p. 490–519, 1996.

HALGREN, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. **J Comp. Chem.**, v. 20, n. 7, p. 720–729, 1999.

HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.

HO, B. T. *et al.* Uses of an innovative ethylene- $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complex powder for ripening of mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 113, p. 77–86, 2016.

HOLTJE, H.-D.; FOLKERS, G. Small Molecules. *In*: **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 1996. p. 9–64.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

**Hyperchem**. Hypercube. Inc., 2002.

ILLAPAKURTHY, A. C. *et al.* Interaction of artemisinin and its related compounds with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in solution state: experimental and molecular-modeling studies. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 92, n. 3, p. 649–655, 2003.

JAIN, A. N. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 10, n. 5, p. 427–440, 1996.

JAIN, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 4, p. 499–511, 13 2003.

JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727–48, 4 1997.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of molecular biology**, v. 245, n. 1, p. 43–53, 6 1995.

JUNQUERA, E.; MARTIN-PASTOR, M.; AICART, E. Molecular encapsulation of flurbiprofen and/or ibuprofen by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in aqueous solution. Potentiometric and molecular modeling studies. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 4349–4358, 1998.

KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 5, p. 799, 1993.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 167–180, 2013.

LEILA, N. *et al.* Molecular modeling investigation of para-nitrobenzoic acid interaction in  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 160, n. 1, p. 1–7, 2011.

LI, S.; PURDY, W. C. Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 6, p. 1457–1470, 1992.

LIPKOWITZ, K. B. Applications of Computational Chemistry to the Study of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1829–1874, 30 1998.

LIU, X. I. N. *et al.* Inclusion of Acitretin into Cyclodextrins: Phase Solubility, Photostability, and Physicochemical Characterization. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 92, n. 12, p. 2449–2457, 2003.

LLC, S. **The PyMOL Molecular Graphics System**, 2010. Disponível em: <[www.pymol.org](http://www.pymol.org)>

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 1–11, 1 2007.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 57, n. 1-4, p. 545–552, 23 2007.

LUENBERGER, D. G.; YE, Y. **Linear and Nonlinear Programming**. 4. ed. New York: Springer, 2008. p. 555

MENDONÇA, E. A M. *et al.* Enhanced antiproliferative activity of the new anticancer candidate LPSF/AC04 in cyclodextrin inclusion complexes encapsulated into liposomes. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1355–66, 2012.

METROPOLIS, N. *et al.* Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. **The Journal of Chemical Physics**, v. 21, n. 6, p. 1087, 1953.

MILETIC, T. *et al.* Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 122–131, 2013.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (EDS.). **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1. ed. [s.l.] Livraria da Física, 2007. p. 539

MORRIS, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **J Comput Chem**, v. 30, p. 2785–2791, 2009.

MURA, P. *et al.* Interaction between naproxen and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrins in the liquid and solid state. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 347–355, 1995.

O'BOYLE, N. M.; VANDERMEERSCH, T.; *et al.* Confab - Systematic generation of diverse low-energy conformers. **Journal of cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 8, 2011.

O'BOYLE, N. M.; BANCK, M.; *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of cheminformatics**, v. 3, p. 33, 2011.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 6, p. 70–83, 2009.

OPENBABEL. **The Open Babel Package**, 2013. Disponível em: <<http://openbabel.org>>

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–12, 2004.

PONDER, J. W.; CASE, D. A. Force Fields for Protein Simulations. **Advances in Protein Chemistry**, v. 66, p. 27–85, 2003.

QT. **Qt - cross-platform application and UI framework**, 2014. Disponível em: <<http://qt.io/>>

RAPPE, A. K. *et al.* UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. **Journal of American Chemical Society**, v. 114, p. 10024–10035, 1992.

RAREY, M. *et al.* A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of molecular biology**, v. 261, n. 3, p. 470–89, 23 1996.

RATHMANN, U.; WILGEN, J. **Qwt - Qt Widgets for Technical Applications**, 2002. Disponível em: <<http://qwt.sourceforge.net/>>

ROCHA, G. B. *et al.* RM1 : A Reparameterization of AM1 for H , C , N , O , P , S , F , Cl , Br , and I. **Journal of Computational Chemistry**, v. 02, 2006.

RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 43–49, 2001.

SAENGER, W. *et al.* Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1787–1802, 1998.

SAPINO, S. *et al.* On the complexation of Trolox with methyl- $\beta$ -cyclodextrin: characterization, molecular modelling and photostabilizing properties. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, p. 179–186, 2008.

SCHMIDT, A. K. *et al.* Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a derivative of its main product Beta-cyclodextrin. **Biochemistry**, v. 37, n. 97, p. 5909–5915, 1998.

SCHUTTELKOPF, A. W.; AALTEN, D. M. F. VAN. PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, p. 1355–1363, 2004.

SERIDI, L.; BOUFELFEL, A. Simulations of docking C60 in  $\beta$ -Cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 162, n. 2, p. 69–77, 2011.

SERIDI, S. *et al.* Host–guest interaction between 3,4-dihydroisoquinoline-2(1H)-sulfonamide and  $\beta$ -cyclodextrin: Spectroscopic and molecular modeling studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1052, p. 8–16, 2013.

SEYEDI, S. M. *et al.* Synthesis of new series of alpha-cyclodextrin esters as dopamine carrier molecule. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 4307–4311, 2011.

SHOICHET, B. K.; BODIAN, D. L.; KUNTZ, I. D. Molecular Docking Using Shape Descriptors. **Journal of computational chemistry**, v. 13, n. 3, p. 379–397, 1992.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 209–220, 1989.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of molecular modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173–213, 2007.

STEWART, J. J. P. **MOPAC** Colorado Springs, CO, USA Stewart Computational Chemistry, 2012.

TAKAHASHI, K. Organic Reactions Mediated by Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2013–2034, 1998.

TOKUMURA, T. *et al.* Enhancement of bioavailability of cinnarizine from its  $\beta$ -cyclodextrin complex on oral administration with dl-phenylalanine as a competing agent. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p. 391–394, 1986.

TREIB, J. *et al.* An international view of hydroxyethyl starches. **Intensive care medicine**, v. 25, p. 258–68, 1999.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–61, 30 2010.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045–2076, 1998.

WANG, J. M. *et al.* Development and testing of a general amber force field. **J. Comput. Chem.**, v. 25, p. 1157–1174, 2004.

WANG, R.; LAI, L.; WANG, S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 16, n. 1, p. 11–26, 2002.

WENZ, G. Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 33, p. 803–822, 1994.

YANG, L. *et al.* Preparation of highly pure daidzin on oligo- $\beta$ -cyclodextrin-Sepharose HP and investigation of chromatographic behavior of isoflavones by molecular docking. **Journal of chromatography. B**, v. 879, n. 20, p. 1773–80, 15 2011.

ZHANG, G. *et al.* A study on the chiral recognition mechanism of enantioseparation of adrenaline and its analogues using capillary electrophoresis. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 55, n. 2, p. 324–7, 2007.

## 8 APÊNDICES

### Apêndice A

Trabalho submetido em revista indexada, diretamente relacionado com o tema desta tese de doutorado.

**Journal of Computer-Aided Molecular Design**  
**CycloMolder: a platform for modeling host:guest inclusion complexes of cyclodextrins and derivatives**  
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JCAM-D-16-00033	
Full Title:	CycloMolder: a platform for modeling host:guest inclusion complexes of cyclodextrins and derivatives	
Article Type:	Original Research Article	
Keywords:	cyclomolder; cyclodextrin; inclusion complex; molecular modeling; docking	
Corresponding Author:	Marcelo Zaldini Hernandes Federal University of Pernambuco Recife, Pernambuco	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Pernambuco	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Marcelo Montenegro Rabello	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Marcelo Montenegro Rabello Marcelo Zaldini Hernandes	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR) (445807/2014-8)	PhD. Marcelo Zaldini Hernandes
Abstract:	<p>This paper presents a platform to build cyclodextrin derivatives models and evaluate their ability by forming inclusion complexes, using a graphical user interface in a friendly and intuitive way. This goal was outlined to facilitate the studies of molecular modeling, particularly for drug design and pharmaceutical technology, and also to attract experimental groups with demands in this research field. The platform (CycloMolder) consists of two modules: CycloGen and CycloDock. The first module (CycloGen) builds models with more than one chemical structure to represent a cyclodextrin derivative. These structures are divided into configurations and conformations. The configurations can be homologous structures, with different molar substitution ratio, or just positional isomers. Conformers are generated from the built configurations. The second module (CycloDock) performs the docking calculations between the host (cyclodextrins and/or their derivatives) and guest molecules, using the AutoDock Vina program, and displays the final results of the modeled inclusion complexes, including graphs showing the distribution energy and intermolecular interactions present in the host:guest complex. The CycloMolder program was tested and validated for (2-hydroxypropyl)-<math>\beta</math>-cyclodextrin host. The tests emphasize the importance of generating more than one chemical structure (configuration) to better represent a CD derivative model, within a statistical approach. Tests also showed the analytical potential of the program, provided by the automation of the modeling study, performing calculations and resulting analysis. Overall, the CycloMolder program achieves its goals by automating and simplifying the in silico studies of inclusion complexes with cyclodextrins, mainly contributing to the pharmaceutical technology field.</p>	

## Apêndice B

Trabalho publicado em revista indexada, diretamente relacionado com os complexos de inclusão com ciclodextrinas.

AAPS PharmSciTech, Vol. 13, No. 4, December 2012 (© 2012)  
DOI: 10.1208/s12249-012-9853-9

### Research Article

## Enhanced Antiproliferative Activity of the New Anticancer Candidate LPSF/AC04 in Cyclodextrin Inclusion Complexes Encapsulated into Liposomes

Elisângela A. M. Mendonça,<sup>1,2</sup> Mariane C. B. Lira,<sup>2,3</sup> Marcelo M. Rabello,<sup>4</sup> Isabela M. F. Cavalcanti,<sup>2</sup> Suelly L. Galdino,<sup>5</sup> Ivan R. Pitta,<sup>5</sup> Maria do Carmo A. Lima,<sup>5</sup> Maira G. R. Pitta,<sup>6</sup> Marcelo Z. Hernandez,<sup>4</sup> and Nereide S. Santos-Magalhães<sup>3,7</sup>

Received 12 April 2012; accepted 10 September 2012; published online 2 October 2012

**Abstract.** LPSF/AC04 (5Z)-[5-acridin-9-ylmethylene-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione] is an acridine-based derivative, part of a series of new anticancer agents synthesized for the purpose of developing more effective and less toxic anticancer drugs. However, the use of LPSF/AC04 is limited due to its low solubility in aqueous solutions. To overcome this problem, we investigated the interaction of LPSF/AC04 with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CyD) and hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin (HP- $\gamma$ -CyD) in inclusion complexes and determine which of the complexes formed presents the most significant interactions. In this paper, we report the physical characterization of the LPSF/AC04-HP-CyD inclusion complexes by thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy absorption, Raman spectroscopy, <sup>1</sup>HNMR, scanning electron microscopy, and by molecular modeling approaches. In addition, we verified that HP- $\beta$ -CyD complexation enhances the aqueous solubility of LPSF/AC04, and a significant increase in the antiproliferative activity of LPSF/AC04 against cell lines can be achieved by the encapsulation into liposomes. These findings showed that the nanoencapsulation of LPSF/AC04 and LPSF/AC04-HP-CyD inclusion complexes in liposomes leads to improved drug penetration into the cells and, as a result, an enhancement of cytotoxic activity. Further *in vivo* studies comparing free and encapsulated LPSF/AC04 will be undertaken to support this investigation.

**KEY WORDS:** acridine; cyclodextrins; cytotoxicity; liposomes; modeling.

### INTRODUCTION

Acridine derivatives have a long and successful history in the treatment of human diseases, particularly for parasite infections and cancer (1–3). A variety of acridine derivatives has been synthesized and, in some cases, promising results have been obtained, prompting the development of new acridine-based drugs (3). The major example of these molecules is *m*-amsacrine, a well-known anticancer agent used to treat some types of cancers, including acute adult leukemia (1,4). Their strong activity was due to the ability of acridine nucleus to intercalate into DNA base pairs. This intercalative property

has been attributed to the planar aromatic system of the acridine moiety (5).

LPSF/AC04 (5Z)-[5-acridin-9-ylmethylene-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione] (Fig. 1) is a synthesized acridinylidene thiazolidine dione, a monoacridine structural analogue of *m*-amsacrine (6). LPSF/AC04 revealed antitumor activity with tumor inhibition of more than 85% in a murine sarcoma 180 model after 8 days of treatment with 100 mg/kg *i.p.*/day (7). In addition, a recent study presented a preliminary pharmacokinetics of LPSF/AC04 with a half-life of 66 h, which accumulated in different tissues (8). However, heterocyclic acridine derivatives such as LPSF/AC04 are characterized by low solubility in aqueous solutions, as a result of which clinical trials and its therapeutic use have remained limited.

Cyclodextrins (CyDs) have a relatively nonpolar cylindrical cavity that can bind, and thereby solubilize, a wide range of hydrophobic molecules (9,10). A greater number of reports mentioned the use of cyclodextrins in the formation of inclusion complexes with hydrophobic drugs, including acridine derivatives, for enhancement of their solubility (9–14).

The encapsulation of hydrophobic drugs in nanocarriers, such as liposomes, is also of great importance (15). Moreover, the entrapment of inclusion complexes into drug delivery systems, such as liposomes, can modulate *in vivo* dissociation of the drug/CyD complex, thereby contributing to improvements in the pharmacokinetic profile, chemical stability, and

<sup>1</sup> Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), João Pessoa, PB, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

<sup>3</sup> Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Recife, PE, Brazil.

<sup>4</sup> Laboratório de Química Teórica Medicinal-UFPE, Recife, PE, Brazil.

<sup>5</sup> Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos-UFPE, Recife, PE, Brazil.

<sup>6</sup> Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas-UFPE, Recife, PE, Brazil.

<sup>7</sup> To whom correspondence should be addressed. (e-mail: nereide.magalhaes@gmail.com)

## Apêndice C

Outros trabalhos publicados em revistas indexadas.

Structural Investigation of Anti-*Trypanosoma cruzi* 2-Iminothiazolidin-4-ones Allows the Identification of Agents with Efficacy in Infected Mice

Diogo Rodrigo Magalhaes Moreira,<sup>\*,†,‡</sup> Salvana Priscylla Manso Costa,<sup>‡</sup> Marcelo Zaldini Hernandez,<sup>‡</sup> Marcelo Montenegro Rabello,<sup>‡</sup> Gevanio Bezerra de Oliveira Filho,<sup>‡</sup> Cristiane Moutinho Lagos de Melo,<sup>§</sup> Lucas Ferreira da Rocha,<sup>§</sup> Carlos Alberto de Simone,<sup>||</sup> Rafaela Salgado Ferreira,<sup>†</sup> Jordana Rodrigues Barbosa Fradico,<sup>†</sup> Cássio Santana Meira,<sup>1</sup> Elisalva Teixeira Guimarães,<sup>1,#</sup> Rajendra Mohan Srivastava,<sup>†</sup> Valéria Rêgo Alves Pereira,<sup>§</sup> Milena Botelho Pereira Soares,<sup>1,♦</sup> and Ana Cristina Lima Leite<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas and da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

<sup>‡</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil

<sup>§</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, CEP, 50670-420, Salvador-PE, Brazil

<sup>||</sup>Departamento de Física and Informática, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

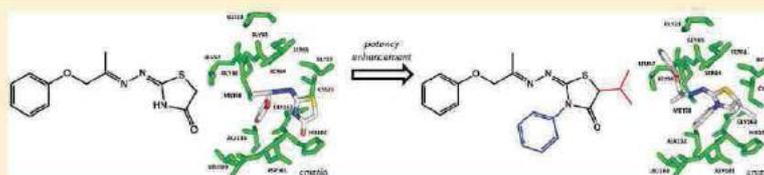
<sup>†</sup>Departamento de Bioquímica and Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>#</sup>Departamento de Ciências da Vida, Universidade Estadual da Bahia, CEP 41150-000, Salvador, BA, Brazil

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 40296-710, Salvador, BA, Brazil

<sup>♦</sup>Centro de Biotecnologia and Terapia Celular, Hospital São Rafael, CEP 41253-190, Salvador, BA, Brazil

## Supporting Information



**ABSTRACT:** We modified the thiazolidinic ring at positions N3, C4, and C5, yielding compounds 6–24. Compounds with a phenyl at position N3, 15–19, 22–24, exhibited better inhibitory properties for cruzain and against the parasite than 2-iminothiazolidin-4-one 5. We were able to identify one high-efficacy trypanocidal compound, 2-iminothiazolidin-4-one 18, which inhibited the activity of cruzain and the proliferation of epimastigotes and was cidal for trypomastigotes but was not toxic for splenocytes. Having located some of the structural determinants of the trypanocidal properties, we subsequently wished to determine if the exchange of the thiazolidine for a thiazole ring leaves the functional properties unaffected. We therefore tested thiazoles 26–45 and observed that they did not inhibit cruzain, but they exhibited trypanocidal effects. Parasite development was severely impaired when treated with 18, thus reinforcing the notion that this class of heterocycles can lead to useful cidal agents for Chagas disease.

## INTRODUCTION

The World Health Organization estimates that 5–10% of Latin America's population is afflicted by Chagas disease, which is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*.<sup>1</sup> Current treatment is solely based on benznidazole (Bdz), a nitroimidazole compound. Bdz is cidal for bloodstream trypomastigotes and thus efficient in eliminating parasite in circulation during the initial stages of infection (acute and asymptomatic chronic).<sup>2,3</sup> The efficacy of Bdz for patients with Chagas-related cardiomyopathy is still unknown,

although a clinical trial (BENEFIT) aiming to investigate this is expected to be concluded in 2013.<sup>4,5</sup> However, many patients experience drug intolerance and adverse effects for Bdz.<sup>6</sup> Thus, there is a need to look for other drugs to treat Chagas disease.

A useful strategy for anti-*T. cruzi* drug design is to inhibit the cysteine protease cruzain. Most of the functional properties of

Received: July 25, 2012

Published: November 20, 2012

## RESEARCH ARTICLE

## Open Access

## Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai* venom

Rafael M Ximenes<sup>1</sup>, Renata S Alves<sup>2</sup>, Ticiane P Pereira<sup>2</sup>, Renata M Araújo<sup>3,4</sup>, Edilberto R Silveira<sup>4</sup>, Marcelo M Rabello<sup>5</sup>, Marcelo Z Hernandez<sup>5</sup>, Veronica CG Soares<sup>6,7</sup>, Daniel Bristot<sup>7</sup>, Camila L Pires<sup>7</sup>, Daniela O Toyama<sup>8</sup>, Henrique H Gaeta<sup>7</sup>, Helena SA Monteiro<sup>1</sup> and Marcos H Toyama<sup>7\*</sup>

### Abstract

**Background:** Harpalycin 2 (HP-2) is an isoflavone isolated from the leaves of *Harpalyce brasiliensis* Benth., a snakeroot found in northeast region of Brazil and used in folk medicine to treat snakebite. Its leaves are said to be anti-inflammatory. Secretory phospholipases A<sub>2</sub> are important toxins found in snake venom and are structurally related to those found in inflammatory conditions in mammals, as in arthritis and atherosclerosis, and for this reason can be valuable tools for searching new anti-phospholipase A<sub>2</sub> drugs.

**Methods:** HP-2 and piratoxin-III (PrTX-III) were purified through chromatographic techniques. The effect of HP-2 in the enzymatic activity of PrTX-III was carried out using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid as the substrate. PrTX-III induced platelet aggregation was inhibited by HP-2 when compared to aristolochic acid and p-bromophenacyl bromide (p-BPB). In an attempt to elucidate how HP-2 interacts with PrTX-III, mass spectrometry, circular dichroism and intrinsic fluorescence analysis were performed. Docking scores of the ligands (HP-2, aristolochic acid and p-BPB) using PrTX-III as target were also calculated.

**Results:** HP-2 inhibited the enzymatic activity of PrTX-III (IC<sub>50</sub> 11.34 ± 0.28 µg/mL) although it did not form a stable chemical complex in the active site, since mass spectrometry measurements showed no difference between native (13,837.34 Da) and HP-2 treated PrTX-III (13,856.12 Da). A structural analysis of PrTX-III after treatment with HP-2 showed a decrease in dimerization and a slight protein unfolding. In the platelet aggregation assay, HP-2 previously incubated with PrTX-III inhibited the aggregation when compared with untreated protein. PrTX-III chemical treated with aristolochic acid and p-BPB, two standard PLA<sub>2</sub> inhibitors, showed low inhibitory effects when compared with the HP-2 treatment. Docking scores corroborated these results, showing higher affinity of HP-2 for the PrTX-III target (PDB code: 1GMZ) than aristolochic acid and p-BPB. HP-2 previous incubated with the platelets inhibits the aggregation induced by untreated PrTX-III as well as arachidonic acid.

**Conclusion:** HP-2 changes the structure of PrTX-III, inhibiting the enzymatic activity of this enzyme. In addition, PrTX-III platelet aggregant activity was inhibited by treatment with HP-2, p-BPB and aristolochic acid, and these results were corroborated by docking scores.

**Keywords:** PrTX-III, Phospholipase A<sub>2</sub>, *Bothrops pirajai*, *Harpalyce brasiliensis*, Isoflavone

\* Correspondence: [mhtpp@yahoo.com](mailto:mhtpp@yahoo.com)

<sup>1</sup>São Vicente Unit, State University of São Paulo, Júlio Mesquita Filho, UNESP, Praça Infante Dom Henrique, s/n, São Vicente, SP 11330-908, Brazil  
 Full list of author information is available at the end of the article



Hindawi Publishing Corporation  
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine  
Volume 2012, Article ID 987517, 9 pages  
doi:10.1155/2012/987517

## Research Article

# Inhibition of Neurotoxic Secretory Phospholipases A<sub>2</sub> Enzymatic, Edematogenic, and Myotoxic Activities by Harpalycin 2, an Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliana* Benth

Rafael M. Ximenes,<sup>1</sup> Marcelo M. Rabello,<sup>2</sup> Renata M. Araújo,<sup>3,4</sup> Edilberto R. Silveira,<sup>4</sup>  
Fábio H. R. Fagundes,<sup>5,6</sup> Eduardo B. S. Diz-Filho,<sup>5,6</sup> Simone C. Buzzo,<sup>5,6</sup>  
Veronica C. G. Soares,<sup>5,6</sup> Daniela de O. Toyama,<sup>7</sup> Henrique H. Gaeta,<sup>6</sup>  
Marcelo Z. Hernandez,<sup>2</sup> Helena S. A. Monteiro,<sup>1</sup> and Marcos H. Toyama<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo 1315, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 50078-970 Natal, RN, Brazil

<sup>4</sup> Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREN), Universidade Federal do Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>5</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Biomedicina, Universidade de Campinas, 13082-862 Campinas, SP, Brazil

<sup>6</sup> Unidade de São Vicente, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 11330-900 São Vicente, SP, Brazil

<sup>7</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 01302-970 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Helena S. A. Monteiro, hsamonteiro@gmail.com

Received 26 March 2012; Revised 19 June 2012; Accepted 22 June 2012

Academic Editor: Jang-Hern Lee

Copyright © 2012 Rafael M. Ximenes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Secretory phospholipases A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) exert proinflammatory actions through lipid mediators. These enzymes have been found to be elevated in many inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, sepsis, and atherosclerosis. The aim of this study was to evaluate the effect of harpalycin 2 (Har2), an isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliana* Benth., in the enzymatic, edematogenic, and myotoxic activities of sPLA<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai*, *Crotalus durissus terrificus*, *Apis mellifera*, and *Naja naja* venoms. Har2 inhibits all sPLA<sub>2</sub> tested. PrTX-III (*B. pirajai* venom) was inhibited at about 58.7%, Cdt F15 (*C. d. terrificus* venom) at 78.8%, Apis (from bee venom) at 87.7%, and *Naja* (*N. naja* venom) at 88.1%. Edema induced by exogenous sPLA<sub>2</sub> administration performed in mice paws showed significant inhibition by Har2 at the initial step. In addition, Har2 also inhibited the myotoxic activity of these sPLA<sub>2</sub>s. In order to understand how Har2 interacts with these enzymes, docking calculations were made, indicating that the residues His48 and Asp49 in the active site of these enzymes interacted powerfully with Har2 through hydrogen bonds. These data pointed to a possible anti-inflammatory activity of Har2 through sPLA<sub>2</sub> inhibition.

## 1. Introduction

The flavonoids are a group of plant secondary metabolites widely distributed in nature. They are divided in two main classes: the flavonoids and the isoflavonoids. Many pharmacological activities have been described for both classes such as anti-inflammatory and antioxidant, antiallergic, antiviral,

and anticancer [1, 2]. Many works have shown the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitory effects of flavonoids such as rutin [3], morin [4], and quercetin [5], however, only few works have been shown the antiphospholipase A<sub>2</sub> activity of isoflavonoids [6].

The PLA<sub>2</sub>s are a class of enzymes (EC 3.1.1.4) that catalyzes the hydrolysis of the sn-2 ester bond of phospholipids



## Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor

José Roberto Santin<sup>a</sup>, Flávia D.T. Uchôa<sup>b</sup>, Maria do Carmo A. Lima<sup>b</sup>, Marcelo M. Rabello<sup>c</sup>, Isabel Daufenback Machado<sup>a</sup>, Marcelo Z. Hernandez<sup>c</sup>, Angelica A. Amato<sup>d</sup>, Flora Aparecida Milton<sup>d,e</sup>, Paul Webb<sup>e</sup>, Francisco de Assis Rocha Neves<sup>d</sup>, Suely L. Galdino<sup>b</sup>, Ivan Rocha Pitta<sup>b</sup>, Sandra H.P. Farsky<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSE, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Química Teórica Medicinal – LQTM, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Farmacologia Molecular, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brazil

<sup>e</sup>Diabetes Research Center, Methodist Hospital Research Institute, Houston, TX, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 October 2012

Received in revised form 10 December 2012

Accepted 21 December 2012

Available online 7 January 2013

#### Keywords:

Inflammation

Mice

Interleukin-1 $\beta$

Neutrophils

GW9962

Air pouch

### ABSTRACT

The compound (5Z)-5-[(5-bromo-1H-indol-3-yl)methylene]-3-(4-chlorobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione (LYSO-7) was synthesised in order to obtain a new type of anti-inflammatory drug, designed with hybrid features to inhibit cyclooxygenase (COX) and also to activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). Results obtained from docking (in silico) studies corroborated with experimental data, showing the potential affinity between the studied ligand and targets. The specificity of LYSO-7 for COX-enzymes was detected by the inhibition of COX-1 and COX-2 activities by 30% and 20%, respectively. In transactivation reporter gene assays LYSO-07 showed a pan partial agonist effect on the three PPAR subtypes (PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$ ). The agonist action on PPAR $\gamma$  was also observed by a pharmacological approach, as the reduction in the *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) secretion and nitric oxide (NO) production by mouse neutrophils was blocked by GW9962, a specific PPAR $\gamma$  antagonist. Additionally, the *in vivo* effect was measured by reduced carrageenan-induced neutrophil influx into the subcutaneous tissue of mice. Taken together, these data show that LYSO-7 displays a potent *in vivo* anti-inflammatory effect during the innate acute response, which is dependent on its associated COX inhibitory activities and PPAR activation.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Inflammation is a complex process and is involved in the genesis of a diversity of diseases, including degenerative and metabolic disorders. Recent data have shown that inflammation is associated to diabetes, obesity, Parkinson's and Alzheimer's diseases, cancer, and other disorders (Franks and Slansky, 2012; Eikelenboom et al., 2012; Durrenberger et al., 2012; Karalis et al., 2009). Therefore, anti-inflammatory agents have been used for the treatment of classical inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, respiratory and cardiovascular diseases (McCormack, 2011). Nevertheless, anti-inflammatory treatment may be impaired by the occurrence of adverse effects (Sostres et al., 2010), which leads to the removal of specific anti-inflammatory agents from therapy. In fact, the diversity of signalling pathways involved in the process al-

lows the development of distinct chemical molecules to inhibit enzymes, membrane and intracellular receptors, transcription factors, and others.

Neutrophils are involved in the first line of host defence, as they are mobilised to the site of a lesion at the early stages of an acute inflammatory response and also act as a signalling cells at the interface of the innate and adaptive inflammatory responses (Kobayashi and DeLeo, 2009). At the site of injury, neutrophils phagocytose and destroy invading microorganisms, produce reactive oxygen intermediate species (ROS), release proteolytic enzymes and secrete chemical mediators, such as arachidonic acid metabolites, cytokines and nitric oxide (NO) (Segel et al., 2011). Exacerbated or non-regulated neutrophil activities, associated with an inappropriate resolution of the process, contribute to persistent tissue damage that underlies many inflammatory diseases. Therefore, anti-inflammatory drugs must be efficient to halt an exacerbated reaction and should target neutrophils, considering their relevance to the evolution of the process (Segel et al., 2011).

The migration and activation of neutrophils is dependent on the broad action of chemical mediators, which activate membrane or

\* Corresponding author. Address: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13B, CEP: 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. Tel.: +55 11 3091 1193/2197.

E-mail address: [sfarsky@usp.br](mailto:sfarsky@usp.br) (S.H.P. Farsky).



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Isolation, homology modeling and renal effects of a C-type natriuretic peptide from the venom of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*)



Renata S. Alves<sup>a</sup>, Rafael M. Ximenes<sup>b,1</sup>, Antonio R.C. Jorge<sup>b</sup>,  
 Nilberto R.F. Nascimento<sup>c</sup>, René D. Martins<sup>d</sup>, Marcelo M. Rabello<sup>e</sup>,  
 Marcelo Z. Hernandez<sup>e</sup>, Daniela O. Toyama<sup>f</sup>, Marcos H. Toyama<sup>g</sup>,  
 Alice M.C. Martins<sup>a</sup>, Alexandre Havt<sup>b</sup>, Helena S.A. Monteiro<sup>b,h</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Rua Cap. Francisco Pedro 1210, 60430-370 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>d</sup> Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório s/n,

55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá s/n, 50740-520 Recife, PE, Brazil

<sup>f</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, Rua da Consolação 896,

01302-970 São Paulo, SP, Brazil

<sup>g</sup> Unidade de São Vicente, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Praça Infante Dom Henrique s/n,

11330-900 São Vicente, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 April 2013

Received in revised form 9 July 2013

Accepted 16 July 2013

Available online 31 July 2013

#### Keywords:

*Tityus serrulatus*

Natriuretic peptide

Kidney perfusion

Natriuretic peptide receptor

Guanylate cyclase C

### ABSTRACT

Mammalian natriuretic peptides (NPs) have been extensively investigated for use as therapeutic agents in the treatment of cardiovascular diseases. Here, we describe the isolation, sequencing and tridimensional homology modeling of the first C-type natriuretic peptide isolated from scorpion venom. In addition, its effects on the renal function of rats and on the mRNA expression of natriuretic peptide receptors in the kidneys are delineated. Fractionation of *Tityus serrulatus* venom using chromatographic techniques yielded a peptide with a molecular mass of 2190.64 Da, which exhibited the pattern of disulfide bridges that is characteristic of a C-type NP (TsNP, *T. serrulatus* Natriuretic Peptide). In the isolated perfused rat kidney assay, treatment with two concentrations of TsNP (0.03 and 0.1 µg/ml) increased the perfusion pressure, glomerular filtration rate and urinary flow. After 60 min of treatment at both concentrations, the percentages of sodium, potassium and chloride transport were decreased, and the urinary cGMP concentration was elevated. Natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) mRNA expression was down regulated in the kidneys treated with both concentrations of TsNP, whereas NPR-B, NPR-C and GC-C mRNAs were up regulated at the 0.1 µg/mL concentration. In conclusion, this work describes the isolation and modeling of the first natriuretic peptide isolated from scorpion venom. In addition, examinations of the renal actions of TsNP indicate that its effects may be related to the activation of NPR-B, NPR-C and GC-C.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 8247; fax: +55 85 3366 8333.

E-mail address: [hsamonteiro@gmail.com](mailto:hsamonteiro@gmail.com) (H.S.A. Monteiro).

<sup>1</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur de Sá s/n, 50740-520 Recife, PE, Brazil.

DOI: 10.1002/cmdc.201300354

## Structural Design, Synthesis and Structure–Activity Relationships of Thiazolidinones with Enhanced Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity

Diogo Rodrigo Magalhães Moreira,<sup>[a, e]</sup> Ana Cristina Lima Leite,<sup>[b]</sup> Marcos Verissimo Oliveira Cardoso,<sup>[b]</sup> Rajendra Mohan Srivastava,<sup>[a]</sup> Marcelo Zaldini Hernandez,<sup>[b]</sup> Marcelo Montenegro Rabello,<sup>[b]</sup> Luana Faria da Cruz,<sup>[c]</sup> Rafaela Salgado Ferreira,<sup>[c]</sup> Carlos Alberto de Simone,<sup>[d]</sup> Cássio Santana Meira,<sup>[e]</sup> Elisalva Teixeira Guimarães,<sup>[e, f]</sup> Aline Caroline da Silva,<sup>[g]</sup> Thiago André Ramos dos Santos,<sup>[g]</sup> Valéria Rêgo Alves Pereira,<sup>[g]</sup> and Milena Botelho Pereira Soares<sup>[e, h]</sup>

Pharmacological treatment of Chagas disease is based on benznidazole, which displays poor efficacy when administered during the chronic phase of infection. Therefore, the development of new therapeutic options is needed. This study reports on the structural design and synthesis of a new class of anti-*Trypanosoma cruzi* thiazolidinones (**4a–p**). (2-[2-Phenoxy-1-(4-bromophenyl)ethylidene]hydrazono]-5-ethylthiazolidin-4-one (**4h**) and (2-[2-phenoxy-1-(4-phenylphenyl)ethylidene]hydrazono]-5-ethylthiazolidin-4-one (**4l**) were the most potent compounds, resulting in reduced epimastigote proliferation and were toxic to trypomastigotes at concentrations below 10  $\mu\text{M}$ , while they did not display host cell toxicity up to 200  $\mu\text{M}$ . Thiazolidinone **4h** was able to reduce the in vitro parasite burden and the blood parasitemia in mice with similar potency to

benznidazole. More importantly, *T. cruzi* infection reduction was achieved without exhibiting mouse toxicity. Regarding the molecular mechanism of action, these thiazolidinones did not inhibit cruzain activity, which is the major trypanosomal protease. However, investigating the cellular mechanism of action, thiazolidinones altered Golgi complex and endoplasmic reticulum (ER) morphology, produced atypical cytosolic vacuoles, as well as induced necrotic parasite death. This structural design employed for the new anti-*T. cruzi* thiazolidinones (**4a–p**) led to the identification of compounds with enhanced potency and selectivity compared to first-generation thiazolidinones. These compounds did not inhibit cruzain activity, but exhibited strong antiparasitic activity by acting as parasitocidal agents and inducing a necrotic parasite cell death.

### Introduction

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* parasite infection, affects approximately 5–10% of the Latin American population.<sup>[1,2]</sup> The standard treatment is based on benznidazole, a compound able to eliminate the parasite during the acute phase.<sup>[3]</sup> However, during the chronic phase, in which the parasite remains located inside various cell types, benznidazole is

not able to eliminate the parasitism even following long-term administration.<sup>[4]</sup> Human vaccination against *T. cruzi* infection is not available,<sup>[5]</sup> and thus other therapies aiming to control infection or reduce clinical symptoms are being investigated.<sup>[6–8]</sup>

Aiming at the development of more effective medicines, a large number of anti-*T. cruzi* small molecules have been eval-

[a] Dr. D. R. M. Moreira, Prof. R. M. Srivastava  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Departamento de Química Fundamental  
50670-901, Recife, PE (Brazil)  
E-mail: diogollucio@gmail.com

[b] Prof. A. C. Lima Leite, Dr. M. V. O. Cardoso, Prof. M. Z. Hernandez,  
M. M. Rabello  
UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas  
50740-520, Recife, PE (Brazil)

[c] L. F. da Cruz, Prof. R. S. Ferreira  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
31270-901, Belo Horizonte, MG (Brazil)

[d] Prof. C. A. de Simone  
Universidade de São Paulo (USP)  
Departamento de Física e Informática, Instituto de Física  
CEP 13560-970, São Carlos, SP (Brazil)

[e] Dr. D. R. M. Moreira, C. S. Meira, Dr. E. T. Guimarães, Dr. M. B. Pereira Soares  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz  
CEP 40296-710, Salvador, BA (Brazil)

[f] Dr. E. T. Guimarães  
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)  
Departamento de Ciências da Vida  
41150-000, Salvador, BA (Brazil)

[g] A. C. da Silva, T. A. R. dos Santos, Dr. V. R. A. Pereira  
FIOCRUZ, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
50670-420, Recife, PE (Brazil)

[h] Dr. M. B. Pereira Soares  
Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael  
41253-190, Salvador, BA (Brazil)

Supporting information for this article is available on the WWW under  
<http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201300354>.



## Original article

2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation

Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso<sup>a,b,\*</sup>, Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira<sup>a</sup>, Elany Barbosa da Silva<sup>a</sup>, Lívia Bandeira Costa<sup>a</sup>, Marcelo Zaldini Hernandez<sup>a</sup>, Marcelo Montenegro Rabello<sup>a</sup>, Rafaela Salgado Ferreira<sup>b</sup>, Luana Faria da Cruz<sup>b</sup>, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira<sup>c</sup>, Valéria Rêgo Alves Pereira<sup>d</sup>, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro<sup>d</sup>, Paul V. Bernhardt<sup>e</sup>, Ana Cristina Lima Leite<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Farmacéuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 41296-750 Salvador, BA, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 50670-420 Recife, PE, Brazil

<sup>e</sup> School of Chemistry and Molecular Biosciences, University of Queensland, Brisbane 4072, Australia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 April 2014

Received in revised form

1 August 2014

Accepted 5 August 2014

Available online 6 August 2014

## Keywords:

Chagas disease

*Trypanosoma cruzi*

Thiazoles

Hydrazones

2-Pyridine thiosemicarbazone

## ABSTRACT

The present work reports on the synthesis, anti-*Trypanosoma cruzi* activities and docking studies of a novel series of 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles derived from 2-pyridine thiosemicarbazone. The majority of these compounds are potent cruzain inhibitors and showed excellent inhibition on the trypomastigote form of the parasite, and the resulting structure–activity relationships are discussed. Together, these data present a novel series of thiazolyl hydrazones with potential effects against Chagas disease and they could be important leads in continuing development against Chagas disease.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a potentially life-threatening illness caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) [1]. About 7–8 million people worldwide are estimated to be infected with *T. cruzi*, mainly in Latin America.

Over the years, numerous chemical classes against *T. cruzi* have become available, but there is still no effective treatment for all phases of the disease [2]. Recent research has pointed to the ergosterol biosynthetic pathway as a biochemical target [3,4]. Azole derivatives such as posaconazole and ravuconazole, have been tested and presented trypanocidal activity, but they are not yet available as therapeutics [5–7].

Despite the efforts of many investigators in the research of a new anti-Chagas drugs, only two drugs are currently used to treat

it, nifurtimox and benznidazole [6,8] (Fig. 1). Current chemotherapy for Chagas disease is unsatisfactory due to its limited efficacy, particularly in the chronic phase, with frequent side effects that can lead to discontinuation of treatment.

Among a number of drug targets being investigated for Chagas disease, cruzain, the major cysteine protease active in the parasite, is a prominent candidate [9–12]. Cruzain is a cathepsin-L-like protease of the papain family thought to be important for intracellular replication and differentiation of the *T. cruzi* parasite [13]. Among the chemical groups explored for anti-Chagas activity, thiazolyl hydrazones are noteworthy because of their wide biological, especially anti-parasitic, activities [14–17].

In 2004, Greenbaum et al. observed that thiosemicarbazones with a pyridyl moiety inhibit cruzain catalytic activity [18]. Subsequent studies have demonstrated the trypanocidal activity of thiosemicarbazones and their metal complexes. Recently, Caputo et al. have demonstrated trypanocidal activity for a series of 4-arylthiazolylhydrazones [19], with a broad and potent activity for all forms of the parasite. Recently studies have reported inhibition

\* Corresponding author.

E-mail address: [marcosocardoso@gmail.com](mailto:marcosocardoso@gmail.com) (M.V.O. Cardoso).

## Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo · Marina Rocha Galdino-Pitta · Daniel Tarciso Martins Pereira · Juliana Cruz da Silva · Marcelo Montenegro Rabello · Maria do Carmo Alves de Lima · Marcelo Zaldini Hernandez · Ivan da Rocha Pitta · Suely Lins Galdino · Maira Galdino da Rocha Pitta

Received: 31 January 2013 / Accepted: 20 December 2013 / Published online: 8 January 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** Thiazolidinediones are known to have antidiabetic activity, but new activities are being discovered every year; among these, their anticancer activity has received the most attention. In this study, we synthesized three new disubstituted thiazolidinediones and assayed their cytotoxicity against six tumor cell lines, as well as against normal cells. Cytometry studies and molecular modeling were also performed to elucidate the mechanism of cytotoxicity. Of the three new thiazolidinediones synthesized, (5Z)-5-(3-bromo-benzylidene)-3-(4-nitrobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/SF-13) exhibited the most promising activity; it was selectively cytotoxic against leukemia, lymphoma, glioblastoma, and hepatocarcinoma cell lines without being toxic to normal cells. Apoptosis was the main cell death process induced by this compound, although it also induced necrosis. Furthermore, molecular

modeling studies showed that LPSF/SF-13 had good affinity for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; binding to the receptor involved hydrogen bonds with Arg288 and Ser342 residues (bond distances of 3.1 and 2.8 Å, respectively), as well as a  $\pi$ -bonding interaction with His449. We concluded that LPSF/SF-13 is a promising compound for in vivo and combination therapy studies against cancer.

**Keywords** Thiazolidinediones · Cytotoxicity · Anticancer · Molecular modeling

### Introduction

Thiazolidine-2,4-diones have been extensively studied owing to their involvement in the regulation of various physiological processes such as cell proliferation, angiogenesis, inflammation, and glucose metabolism (Barros *et al.*, 2004). These compounds show significant antidiabetic (Mourão *et al.*, 2005), antimicrobial (Gouveia *et al.*, 2008), antichagasic (Du *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2004), anti-HIV (Rawal *et al.*, 2007), anti-inflammatory (Uchôa *et al.*, 2009), and anticancer (Chandrappa *et al.*, 2008) activities.

Thiazolidine-2,4-diones have been shown to have a broad-spectrum antineoplastic activity, including activity against human leukemia (Liu *et al.*, 2006), melanoma (Klopper *et al.*, 2009), prostate cancer (Matsuyama and Yoshimura, 2008), and hepatocarcinoma cells (Wu *et al.*, 2012). These molecules are agonists of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), which is expressed in many human tumors, including lung, breast, colon, prostate, and bladder tumors (Han and Roman, 2007). Thiazolidine-2,4-diones act mainly as tumor suppressors

This article is dedicated to the memory of Suely Lins Galdino.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00044-013-0902-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. J. B. M. Rêgo · J. C. da Silva · S. L. Galdino · M. G. da Rocha Pitta (✉)  
Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil  
e-mail: mgrpitta@gmail.com

M. R. Galdino-Pitta · D. T. M. Pereira · M. C. Alves de Lima · I. da Rocha Pitta  
Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), NUPIT, UFPE, Recife, Brazil

M. M. Rabello · M. Z. Hernandez  
Laboratório de Química Teórica e Medicinal (LQTM), UFPE, Recife, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yphrs](http://www.elsevier.com/locate/yphrs)

## New PPAR $\gamma$ partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr<sup>-/-</sup> mice



Jacqueline C. Silva<sup>a,1</sup>, Fernanda A. César<sup>a,1</sup>, Edson M. de Oliveira<sup>a</sup>, Walter M. Turato<sup>a</sup>, Gustavo L. Tripodi<sup>a</sup>, Gabriela Castilho<sup>b</sup>, Adriana Machado-Lima<sup>b</sup>, Beatriz de las Heras<sup>c</sup>, Lisardo Boscá<sup>d</sup>, Marcelo M. Rabello<sup>e</sup>, Marcelo Z. Hernandez<sup>e</sup>, Marina G.R. Pitta<sup>f</sup>, Ivan R. Pitta<sup>f</sup>, Marisa Passarelli<sup>b</sup>, Martina Rudnicki<sup>a</sup>, Dulcinea S.P. Abdalla<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Lipids Laboratory (UM-10), Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Madrid, Spain

<sup>e</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>f</sup> Core of Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 November 2015

Received in revised form 1 December 2015

Accepted 8 December 2015

Available online 17 December 2015

#### Keywords:

Atherosclerosis  
Diabetes  
Obesity  
PPAR $\gamma$   
Thiazolidinediones

### ABSTRACT

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) regulates multiple pathways involved in the pathogenesis of obesity and atherosclerosis. Here, we evaluated the therapeutic potential of GQ-177, a new thiazolidinedione, on diet-induced obesity and atherosclerosis. The intermolecular interaction between PPAR $\gamma$  and GQ-177 was examined by virtual docking and PPAR activation was determined by reporter gene assay identifying GQ-177 as a partial and selective PPAR $\gamma$  agonist. For the evaluation of biological activity of GQ-177, low-density lipoprotein receptor-deficient (LDLr<sup>-/-</sup>) C57/BL6 mice were fed either a high fat diabetogenic diet (diet-induced obesity), or a high fat atherogenic diet, and treated with vehicle, GQ-177 (20 mg/kg/day), pioglitazone (20 mg/kg/day, diet-induced obesity model) or rosiglitazone (15 mg/kg/day, atherosclerosis model) for 28 days. In diet-induced obesity mice, GQ-177 improved insulin sensitivity and lipid profile, increased plasma adiponectin and GLUT4 mRNA in adipose tissue, without affecting body weight, food consumption, fat accumulation and bone density. Moreover, GQ-177 enhanced hepatic mRNA levels of proteins involved in lipid metabolism. In the atherosclerosis mice, GQ-177 inhibited atherosclerotic lesion progression, increased plasma HDL and mRNA levels of PPAR $\gamma$  and ATP-binding cassette A1 in atherosclerotic lesions. GQ-177 acts as a partial PPAR $\gamma$  agonist that improves obesity-associated insulin resistance and dyslipidemia with atheroprotective effects in LDLr<sup>-/-</sup> mice.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The increasing prevalence of obesity represents a major threat to public health worldwide [1]. This disorder is characterized by imbalance between energy intake and energy expenditure, resulting in the storage of excessive energy as fat in the adipose tissue and increase in body weight [2]. Obesity consists in the main risk factor for insulin resistance, dyslipidemia and hypertension and is

therefore, associated to the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases (CVD) [3].

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors and regulates multiple pathways involved in the pathogenesis of obesity and atherosclerosis, the underlying pathology of CVD [4]. This transcription factor is predominantly expressed in adipose tissue, where it is a major modulator of adipogenesis [5]. Moreover, its activation controls the gene expression of glucose-transporter type 4 (GLUT4) [6], which is involved in glucose homeostasis and the secretion of adipokines, such as adiponectin, which may improve insulin resistance in other tissues [7]. PPAR $\gamma$  expression also occurs in skeletal muscle, kidney, liver and cells of the blood vessel wall, including endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages [8]. Hence, PPAR $\gamma$  activation modulates

\* Corresponding author at: Avenida Professor Lineu Prestes 580, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail addresses: [dsp@usp.br](mailto:dsp@usp.br), [dspabdalla@gmail.com](mailto:dspabdalla@gmail.com) (D.S.P. Abdalla).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

Apêndice D

Trabalho apresentado na forma de pôster no Terceiro Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica (2013)

