



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM FARMÁCIA**

FERNANDA DE FRANÇA GENUÍNO RAMOS CAMPOS

**MODELAGEM MOLECULAR APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO
DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIO DE NOVOS DERIVADOS
ISATÍNICOS-HIDRAZÔNICOS**

**CAMPINA GRANDE – PB
2024**

FERNANDA DE FRANÇA GENUÍNO RAMOS CAMPOS

**MODELAGEM MOLECULAR APLICADA NA
IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE
AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIO DE NOVOS DERIVADOS
ISATÍNICOS-HIDRAZÔNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Química
Farmacêutica e Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

**CAMPINA GRANDE
2024**

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

C198m Campos, Fernanda de França Genuíno Ramos.

Modelagem molecular aplicada na identificação e elucidação do mecanismo de ação anti-inflamatório de novos derivados isatínicos-hidrazônicos [manuscrito] / Fernanda de França Genuíno Ramos Campos. - 2024.

76 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, Departamento de Farmácia - CCBS".

1. Inflamação. 2. Isatínico-hidrazônico. 3. NLRP3. 4. MPGES-1. I. Título

21. ed. CDD 615

FERNANDA DE FRANÇA GENUÍNO RAMOS CAMPOS

MODELAGEM MOLECULAR APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO DO
MECANISMO DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIO DE NOVOS DERIVADOS
ISATÍNICOS-HIDRAZÔNICOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Química
Farmacêutica e Medicinal.

Aprovada em: 25/11/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Igor José dos Santos Nascimento** (***.288.574-**), em **28/11/2024 18:24:04** com chave **17c870beadcf11efb8a81a7cc27eb1f9**.
- **João Augusto Oshiro Junior** (***.616.238-**), em **28/11/2024 19:54:10** com chave **ae8de824addb11ef8f082618257239a1**.
- **Ricardo Olimpio de Moura** (***.632.134-**), em **28/11/2024 17:57:35** com chave **650efe3cadcb11efae2c1a1c3150b54b**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QrCode ao lado ou acesse https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/ e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Termo de Aprovação de Projeto Final

Data da Emissão: 29/11/2024

Código de Autenticação: 74ddac



À Luís Genuíno, avô querido e inventor autodidata, que nunca teve a chance de estudar formalmente, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) por me acolher academicamente e proporcionar recursos financeiros e intelectuais para minha capacitação e realização da pesquisa. Similarmente, agradeço ao financiamento fornecido ao nosso grupo de pesquisa pelas instituições de fomento CAPES, CNPq e Fapesq-PB, possibilitando a execução dos trabalhos.

Agradeço ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAD-SP), projeto UNICAMP/FINEP – MCTI, não apenas por fornecer recursos de processamento computacional científico sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho, mas também pela prestatividade no suporte excelente prestado pelos profissionais deste Centro.

Agradeço aos meus pais, Jansen e Virgínia, ao meu irmão, Iago, e à minha avó, Geralda, por nutrir e incitar a minha curiosidade e paixão pelo conhecimento desde a infância, pelo amor incondicional, paciência, carinho e, principalmente, por sempre serem meus apoiadores nesta carreira acadêmica, jamais deixando de prestar auxílio, orientação e motivação. Amo vocês, mesmo que muitas vezes eu acabe não deixando isto claro. Espero continuar deixando todos vocês orgulhosos.

Agradeço ao meu parceiro de vida, Ivan Bruno, que foi o estopim para que eu pudesse iniciar a minha carreira acadêmica no LDSF, mas que não se limitou a isso e comprometeu-se a me acompanhar para sempre, pelo resto das nossas vidas. Tantas discussões e soluções técnicas deste trabalho foram alcançadas em conjunto durante nossas conversas que você mereceria ser citado como coautor. Te amo, muito! Obrigada por cuidar de mim com tanto apreço. Espero continuar vivendo com você, pelos momentos bons e pelos difíceis, continuar trabalhando em conjunto e, juntos, construirmos um futuro feliz.

Agradeço também à família que me abraçou tão intensamente: meus sogros Geraldo e Socorro e minha cunhada Mirelly, por também prestarem tanto auxílio, carinho e, assim como meus pais, terem tanto orgulho das minhas conquistas.

Agradeço ao Prof. Ricardo por ter acreditado em mim desde o início e possibilitar meu crescimento acadêmico tão sonhado, mas também agradeço pela amizade, cuidado e (muita) paciência investida durante estes anos. Não só em mim, mas em todos os integrantes do LDSF. Acredito que muitos no nosso laboratório

compartilham do mesmo sentimento e admiram sua paixão inabalável pela ciência, pelo ensino e, principalmente, pela Química Farmacêutica e Medicinal. Da mesma forma, agradeço ao Prof. Igor pela parceria e pela assistência e orientação quanto à escrita científica e desenvolvimento dos experimentos de química computacional. O seu bom humor em todas as comunicações é uma característica marcante, e espero que nosso trabalho em conjunto nos últimos anos tenha sido frutífero.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório e, dentre estes, aos meus queridos amigos: Arthur, Karla, Misael e Wallyson. Vocês estiveram e estão constantemente no ambiente físico do nosso laboratório, no qual a presença de vocês ilumina e anima meu humor de uma maneira que talvez não saibam – a ponto de eu passar tardes lá, mesmo sem necessidade, visto que meu trabalho este ano poderia ter sido totalmente remoto. Com vocês foi possível construir uma parceria de mútuo auxílio, na qual eu de fato posso contar com o apoio de todos.

À Karlinha, dedico um agradecimento adicional por fornecer ajuda na parte de escrita e correção, neste trabalho e muitos outros realizados durante o ano, quando eu não tinha mais cabeça para pensar em nada. E a Wally, pelo café de todas as tardes. Parece pouco, mas são coisas muito importantes para mim.

Agradeço à querida amiga que fiz durante a graduação fora do laboratório: Carol, você foi um pilar catalítico para meu crescimento durante este período tão crítico. Em 2019, eu havia caído de paraquedas neste ambiente totalmente diferente e inicialmente hostil, mas isto proporcionou nossa parceria que perdura até hoje. Fazendo jus à sua vocação de farmacêutica clínica, você até mesmo cuidou da minha saúde nos períodos de estresse mais intenso. Me desculpe por não ter mais tanto tempo para passar com você.

Agradeço à minha querida amiga de infância Rebecca, cuja influência nos primeiros anos da infância foi responsável pela minha familiaridade e amor pelos computadores. Agradeço também pela amizade a Thúlio (vulgo Lucy), pela companhia, pelas orientações e reflexões, e por ser um *kindred spirit* até mesmo nos interesses mais inusitados. Desejo profundamente que sejam felizes e que jamais abandonem sua própria essência.

Aos amigos mútuos a mim e Ivan: Palmério, Ruan, Eduardo (vulgo Lúcifer), Luan e Wesley, agradeço pela confiança, pelos conselhos, pelos bons momentos e por terem me apresentado ao amor da minha vida, naquela partida de League (horripilante) comigo jogando (extremamente mal) de Nautilus suporte.

*“O teorema permanecerá inacabado,
E o mundo não saberá da sua descoberta.
De acordo com os cálculos e esquemas,
Ele transformou-se em puro éter.
Ele quer aprender a resolver problemas,
Responder à pergunta ‘ser ou não ser?’
E, imerso em cálculos e esquemas,
Ele sintetiza as formas de viver.”*

Biokonstruktor – Biokonstruktor (1994)

RESUMO

Apesar de ter evoluído como resposta fisiológica para eliminação de ameaças infecciosas ou danos teciduais, a resposta inflamatória pode tornar-se patológica, causando doenças agudas e crônicas. As abordagens terapêuticas tradicionais incluem os corticosteroides e os inibidores das cicloxigenases, porém, estes são conhecidos por efeitos colaterais como imunossupressão e úlceras gástricas. Portanto, para interromper outros estágios da inflamação e abarcar maior versatilidade terapêutica, este trabalho objetivou planejar 54 derivados do *scaffold* (3*E*)-1-(2-anilinoacetil)-3-(metilideno-hidrazinilideno)indolin-2-ona, a fim de avaliar o potencial anti-inflamatório *in silico*. Para tanto, foram realizadas triagens por ancoragem molecular nos alvos Prostaglandina E2 Sintase Microsossomal 1 (mPGES-1) e Proteína com Domínios *NACHT*, Rico em Repetição de Leucinas e Pirina 3 (NLRP3) no *software* GOLD, seguido de simulações de dinâmica molecular no *software* GROMACS dos melhores compostos em complexo com estes alvos, cálculos de energia livre de ligação (ΔG_{LIG}) por Mecânica Molecular – Área de Superfície de Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) com a ferramenta *gmx_MMPBSA*, estudos de Teoria do Funcional de Densidade (DFT) no *software* ORCA e avaliação do perfil farmacocinético *in silico* no *webservice* SwissADME. Embora nenhum dos compostos tenha apresentado bom desempenho na inibição de NLRP3, dois compostos mais promissores na triagem, (3*E*)-1-[2-(2,4-dicloroanilino)acetil]-3-[(*E*)-(3-etóxi-4-hidróxifenil)metilidenohidrazinilideno]indolin-2-ona (LZG-046) e (3*E*)-1-[2-(3-etóxi-4-hidróxianilino)acetil]-3-[(*E*)-quinolin-4-ilmetilidenohidrazinilideno]indolin-2-ona (LZG-085), conseguiram interagir com resíduos essenciais para atividade contra mPGES-1 (LZG-085 com Arg¹²⁶ e Ser¹²⁷; LZG-046 com Thr¹³¹; Arg⁵², Ala¹³⁸, His⁵³ e Leu¹³⁵ com ambos). Entre os compostos avaliados, LZG-046 e LZG-085 destacaram-se por interagir com resíduos essenciais do alvo mPGES-1, com LZG-085 demonstrando superioridade devido à sua estabilidade no sítio ativo durante 100 nanosegundos, maior número de ligações de hidrogênio e previsões farmacocinéticas favoráveis, como alta solubilidade e boa permeabilidade celular, apesar de apresentar alta reatividade e possíveis interações com isoenzimas do citocromo P450. Esses resultados sugerem que LZG-085 é um candidato promissor para futuros ensaios experimentais, com potencial para superar limitações dos anti-inflamatórios atuais.

Palavras-Chave: inflamação; isatínico-hidrazônico; NLRP3; mPGES-1.

ABSTRACT

Although it evolved as a physiological response to eliminate infectious threats or tissue damage, the inflammatory response can become pathological, causing acute and chronic diseases. Traditional therapeutic approaches include corticosteroids and cyclooxygenase inhibitors, but these are known for side effects such as immunosuppression and gastric ulcers. Therefore, to interrupt other stages of inflammation and encompass greater therapeutic versatility, this work aimed to design 54 derivatives of the scaffold (3*E*)-1-(2-anilinoacetyl)-3-(methylidenehydrazinylidene)indolin-2-one, in order to evaluate their anti-inflammatory potential *in silico*. For this purpose, molecular docking screenings were performed on the targets Microsomal Prostaglandin E2 Synthase 1 (mPGES-1) and Protein with NACHT, Rich in Leucine and Pyrin Repeat Domains 3 (NLRP3) in the GOLD software, followed by molecular dynamics simulations in the GROMACS software of the best compounds in complex with these targets, calculations of binding free energy (ΔG_{LIG}) by Molecular Mechanics - Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) with the gmx_MMPBSA tool, Density Functional Theory (DFT) studies in the ORCA software and evaluation of the *in silico* pharmacokinetic profile in the SwissADME webservice. Although none of the compounds performed well in inhibiting NLRP3, two most promising compounds in the screening, (3*E*)-1-[2-(2,4-dichloroanilino)acetyl]-3-[(*E*)-(3-ethoxy-4-hydroxyphenyl)methylidenehydrazinylidene]indolin-2-one (LZG-046) and (3*E*)-1-[2-(3-ethoxy-4-hydroxyanilino)acetyl]-3-[(*E*)-quinolin-4-ylmethylidenehydrazinylidene]indolin-2-one (LZG-085), were able to interact with residues essential for activity against mPGES-1 (LZG-085 with Arg¹²⁶ and Ser¹²⁷; LZG-046 with Thr¹³¹; Arg⁵², Ala¹³⁸, His⁵³, and Leu¹³⁵ with both). Among the evaluated compounds, LZG-046 and LZG-085 stood out for interacting with essential residues of the mPGES-1 target, with LZG-085 demonstrating superiority due to its stability in the active site for 100 nanoseconds, greater number of hydrogen bonds and favorable pharmacokinetic predictions, such as high solubility and good cell permeability, despite presenting high reactivity and possible interactions with cytochrome P450 isoenzymes. These results suggest that LZG-085 is a promising candidate for future experimental trials, with the potential to overcome limitations of current anti-inflammatory drugs.

Keywords: inflammation; isatinic-hydrazonic; NLRP3; mPGES-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Planejamento da série YV-01.....	16
Figura 2 –	Fármacos anti-inflamatórios esteroidais.....	23
Figura 3 –	Fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais.....	23
Figura 4 –	Estrutura da enzima mPGES-1, destacando seus três sítios ativos..	24
Figura 5 –	Estrutura do receptor NLRP3, destacando o domínio <i>NACHT</i>	26
Figura 6 –	Gráficos de Ramachandran para as estruturas cristalográficas.....	38
Figura 7 –	Visualização tridimensional das poses originais e reancoradas para os inibidores em cada alvo.....	39
Figura 8 –	Visualização tridimensional dos compostos ancorados no sítio ativo do alvo mPGES-1.....	42
Figura 9 –	Interações intermoleculares entre 6PW e mPGES-1.....	42
Figura 10 –	Interações intermoleculares entre os 5 melhores compostos e mPGES-1.....	43
Figura 11 –	Visualização tridimensional dos compostos ancorados no sítio ativo do alvo NLRP3.....	46
Figura 12 –	Interações intermoleculares entre NP3-562 e NLRP3.....	46
Figura 13 –	Interações intermoleculares entre os 5 melhores compostos e NLRP3.....	47
Figura 14 –	Gráficos de variação do RMSD ao longo do tempo para os complexos de mPGES-1 com os 5 melhores compostos da ancoragem.....	49
Figura 15 –	Gráficos de variação do RMSD ao longo do tempo para os complexos de NLRP3 com os 5 melhores compostos da ancoragem.....	49
Figura 16 –	Flutuação de RMS por resíduo nos complexos LZG-046/mPGES-1, LZG-085/mPGES-1 e LZG-042/NLRP3.....	51
Figura 17 –	Variação do raio de giro ao longo do tempo nos complexos LZG- 046/mPGES-1, LZG-085/mPGES-1 e LZG-042/NLRP3.....	53
Figura 18 –	Ligações de hidrogênio ligante-alvo formadas ao longo do tempo nos complexos LZG-046/mPGES-1, LZG-085/mPGES-1 e LZG- 042/NLRP3.....	54

Figura 19 – Variação da área de superfície acessível a solvente ao longo do tempo nos complexos LZG-046/mPGES-1, LZG-085/mPGES-1 e LZG-042/NLRP3.....	56
Figura 20 – Posições inicial e final do composto LZG-046 em complexo com mPGES-1 após a simulação.....	57
Figura 21 – Posições inicial e final do composto LZG-085 em complexo com mPGES-1 após a simulação.....	57
Figura 22 – Posições inicial e final do composto LZG-042 em complexo com NLRP3 após a simulação.....	58
Figura 23 – Áreas de densidade eletrônica estimada para os orbitais moleculares de fronteira do composto LZG-085.....	61
Figura 24 – Gráfico BOILED-EGG para o composto LZG-085.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Planejamento de novos derivados para a série LZG.....	32
Quadro 2 – Validação da qualidade das estruturas cristalográficas.....	38
Quadro 3 – Validação do método de ancoragem molecular e resultados.....	40
Quadro 4 – Interações intermoleculares entre compostos ancorados e resíduos de aminoácido na enzima mPGES-1.....	41
Quadro 5 – Interações intermoleculares entre compostos ancorados e resíduos de aminoácido no receptor NLRP3.....	45
Quadro 6 – Cálculos de energia livre de ligação e seus componentes energéticos para os compostos ligados a mPGES-1.....	59
Quadro 7 – Cálculos de energia livre de ligação e seus componentes energéticos para os compostos ligados a NLRP3.....	59
Quadro 8 – Propriedades físico-químicas calculadas por Teoria do Funcional de Densidade.....	60
Quadro 9 – Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas estimadas por análise <i>in silico</i> para o composto LZG-085.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Inflamação	18
3.1.1	<i>Aspectos históricos</i>	18
3.1.2	<i>Mecanismos fisiológicos e moleculares</i>	18
3.1.3	<i>Patologias associadas e importância terapêutica</i>	19
3.1.4	<i>Terapias farmacológicas convencionais e suas limitações</i>	22
3.1.4.1	<i>Anti-inflamatórios esteroidais</i>	22
3.1.4.2	<i>Anti-inflamatórios não-esteroidais</i>	23
3.1.5	<i>Novos alvos terapêuticos promissores</i>	24
3.1.5.1	<i>Prostaglandina E sintase 1 microssomal (mPGES-1)</i>	24
3.1.5.2	<i>Inflamassomo contendo o receptor proteína com domínios NACHT, rico em repetição de leucinas e pirina 3 (NLRP3)</i>	26
3.2	Planejamento de Fármacos Assistido por Computadores (CADD)	27
3.2.1	<i>Métodos computacionais para planejamento de fármacos</i>	28
3.2.1.1	<i>Ancoragem molecular</i>	28
3.2.1.2	<i>Dinâmica molecular</i>	29
3.2.1.2.1	<i>Cálculos de energia livre de ligação por Mecânica Molecular com Área de Superfície Poisson-Boltzmann (MM-PBSA)</i>	29
3.2.1.3	<i>Teoria do funcional de densidade (DFT)</i>	30
3.2.1.4	<i>Métodos in silico de predição da viabilidade farmacocinética</i>	30
4	METODOLOGIA	32
4.1	Planejamento dos análogos isatínicos-hidrazônicos	32
4.2	Triagem dos compostos por ancoragem molecular	32
4.3	Simulações de dinâmica molecular	34
4.3.1	<i>Cálculos de Energia Livre de Ligação por MM-PBSA</i>	35
4.4	Cálculos de teoria do funcional de densidade (DFT)	36
4.5	Avaliação das propriedades farmacocinéticas <i>in silico</i>	37

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Validação das estruturas cristalográficas utilizadas para modelagem molecular	38
5.2	Ancoragem molecular	39
5.2.1	Validação do método e avaliação dos resultados	39
5.2.1.1	<i>Interações intermoleculares previstas com o alvo mPGES-1</i>	40
5.2.1.2	<i>Interações intermoleculares previstas com o alvo NLRP3</i>	44
5.3	Dinâmica molecular	48
5.3.1	Avaliação da estabilidade dos complexos estudados	48
5.3.1.1	<i>Variação de desvio quadrático médio da raiz das posições atômicas (RMSD) ao longo da simulação</i>	48
5.3.1.2	<i>Flutuação de desvio quadrático médio (RMSF) para resíduos de aminoácido dos alvos</i>	50
5.3.1.3	<i>Variação de raio de giro (Rg) ao longo da simulação</i>	52
5.3.1.4	<i>Número de ligações de hidrogênio entre ligante e alvo ao longo da simulação</i>	53
5.3.1.5	<i>Variação de área acessível a solvente (SASA) ao longo da simulação</i>	55
5.3.1.6	<i>Posições inicial e final dos ligantes estudados</i>	56
5.3.2	Análise da energia livre de ligação e seus componentes energéticos obtidos por MM-PBSA	58
5.4	Análise dos cálculos de DFT	59
5.5	Análise do perfil farmacocinético <i>in silico</i> previsto	61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória consiste em uma reação de tecidos vascularizados a infecções e danos tissulares, recrutando da circulação sanguínea uma série de células e moléculas envolvidas na defesa do organismo hospedeiro para os locais atingidos por ameaças, com a finalidade de eliminar os agentes agressores, quando possível (KUMAR et al., 2022). Normalmente, esta é uma resposta essencial para a manutenção da homeostase, mas quando desregulada, pode tornar-se prejudicial, a exemplo dos quadros de choque séptico, doenças autoimunes, fibrose, metaplasias e crescimentos tumorais, assim como quadros crônicos de inflamação que estão envolvidos na patologia de condições como artrite reumatoide, aterosclerose, asma, obesidade, dentre outros. Assim, justifica-se a importância deste processo fisiológico ou, por vezes, patológico, como alvo de intervenção terapêutica, a fim de impedir a morbidade e mortalidade associadas a estes quadros patológicos (MEDZHITOV, 2008; NATHAN; DING, 2010).

Atualmente, no arsenal de fármacos anti-inflamatórios presentes no mercado, existem dois grupos principais: os corticosteroides, atuantes na inibição de receptores intranucleares e supressão da transcrição de genes envolvidos nos processos inflamatórios, e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), inibidores das enzimas prostaglandina G/H sintases ou cicloxigenases (COX) (BRUNTON; KNOLLMANN; HILAL-DANDAN, 2017). Além disto, são bastante conhecidos os efeitos colaterais destas classes, a exemplo do aumento da incidência de eventos cardiovasculares durante o uso de inibidores da cicloxigenase-2 (COX-2) (MELNIKOVA, 2005; ROCHE et al., 2019). Outro exemplo inclui as manifestações gastrointestinais causadas pelos AINEs ou mesmo a imunossupressão, hiperglicemia e hipertensão causadas pelos glicocorticoides (BRUNTON; KNOLLMANN; HILAL-DANDAN, 2017).

Portanto, com o intuito de interromper a resposta inflamatória em diferentes estágios para obter maior diversidade de opções terapêuticas no processo inflamatório (ROCHE et al., 2019), são investigados novos alvos farmacológicos participantes deste mecanismo de defesa.

Dentre estes alvos está a enzima prostaglandina E2 sintase microssomal 1 (mPGES-1 – *microssomal prostaglandin E2 synthase 1*), incumbida de converter as prostaglandinas H2 produzidas pelas enzimas cicloxigenases em prostaglandina E2, capaz de contribuir para a inflamação ao ativar receptores prostanoides nas

superfícies celulares e que também é induzida durante processos inflamatórios, presumindo da mesma maneira uma inibição livre do impedimento das funções constitutivas de enzimas cicloxigenase. Assim, seriam evitados efeitos colaterais associados ao uso de anti-inflamatórios não-esteroidais presentes no mercado (DI MICCO et al., 2018; DOS SANTOS NASCIMENTO; DE AQUINO; DA SILVA JÚNIOR, 2022; PETTERSSON; THORÉN; JAKOBSSON, 2005).

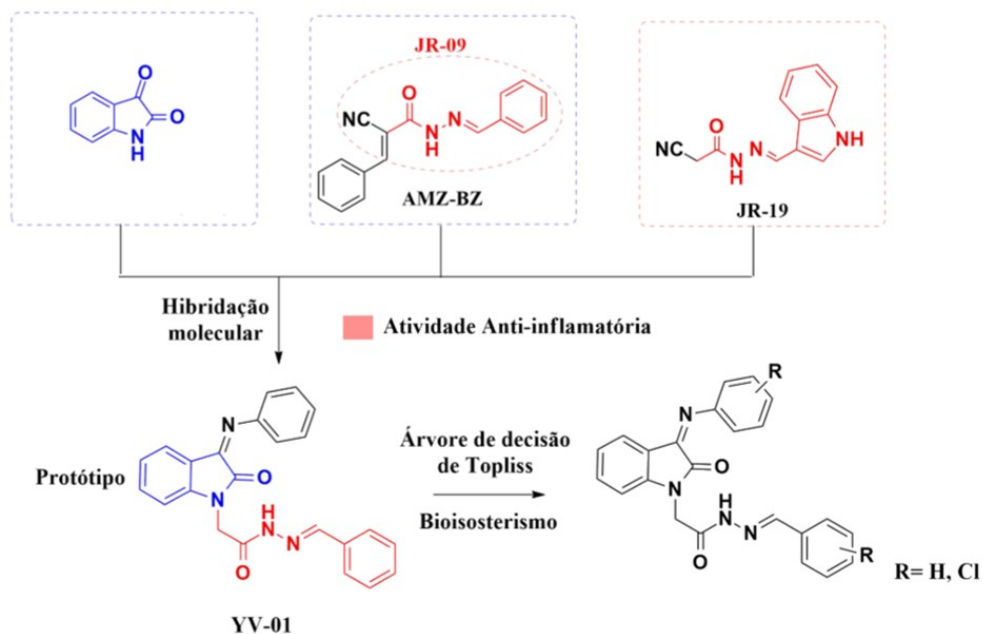
Ademais, são incluídos como alvos promissores os inflamassomos: uma classe de complexos citosólicos de proteínas interventoras da ativação de potentes mediadores químicos inflamatórios e consequente desencadeamento de respostas inflamatórias mediadas por citocinas, descobertos nos últimos 20 anos e revelados como partes integrais da resposta imune inata contra patógenos, sendo ativados ao encontrar infecções ou agentes ofensivos (WANG et al., 2020a). O inflamassomo NLRP3 está envolvido em quadros agudos e crônicos de inflamação patogênica, incluindo papéis na patologia de doenças como aterosclerose, artrite reumatoide, rejeição de transplantes, asma, mal de Alzheimer, dentre outras (MANGAN et al., 2018), justificando assim a atenção direcionada para desenvolvimento de inibidores deste alvo.

Com o advento da integração de cálculos científicos com a computação gráfica, os esforços direcionados ao desenvolvimento de novos fármacos foram acelerados e amplificados pela área do planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD – *computer-assisted drug design*) (BARREIRO et al., 1997). Novos *leads* são descobertos em maior quantidade, maior velocidade e menor gasto de tempo ou recursos financeiros, justificando o uso disseminado destas técnicas em grupos de pesquisa no mundo inteiro (NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR, 2022b).

Recentemente, como demonstra o esquema ilustrado (Figura 1), foram planejados novos derivados isatínicos-hidrazônicos, através de hibridação molecular do núcleo isatínico com porções N-acilhidrazônicas de compostos com atividade anti-inflamatória estudada, bem como por bioisosterismo de grupos substituintes nos anéis aromáticos. Além de apresentarem resultados promissores nos testes *in silico* para afinidade aos alvos mPGES-1 e NLRP3, ensaios *in vitro* demonstraram baixa citotoxicidade dos compostos em macrófagos, e YV-03 demonstrou-se capaz de reduzir níveis de nitrito em concentrações de 0,9 a 500 μ M, apresentando maior potencial anti-inflamatório dentre os compostos planejados (SILVA, 2024). Desta forma, devido à sua acessibilidade sintética e promissoras propriedades

farmacológicas (ADAK et al., 2024; MALIYAKKAL et al., 2024; NATH et al., 2020), os compostos isatínicos-hidrazônicos possuem bom potencial para desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios.

Figura 1 – Planejamento da série YV-01.



Fonte: Adaptado de Silva (2024).

Em vista dos argumentos dispostos, este trabalho visou aplicar técnicas computacionais centradas na estrutura de macromoléculas, amplamente empregues no desenvolvimento de novos fármacos, a fim de estudar a atividade anti-inflamatória de novos derivados isatínicos-hidrazônicos diante de alvos terapêuticos inovadores. Assim, pode ser assegurado que, durante a modelagem molecular, seja encontrado um composto mais promissor e este seja encaminhado para comprovação de sua atividade biológica em estudos posteriores, teoricamente diminuindo custos de ensaios biológicos e tempo de pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Planejar novos derivados isatínicos-hidrazônicos, e propor seu possível mecanismo de ação anti-inflamatório contra mPGES-1 e NLRP3, por meio de técnicas computacionais.

2.2 Objetivos Específicos

- Planejar novos análogos isatínicos-hidrazônicos por meio de triagem virtual, utilizando ancoragem molecular;
- Realizar simulações de dinâmica molecular dos análogos mais promissores na ancoragem molecular;
- Realizar cálculos de energia livre de ligação por meio da técnica de Mecânica Molecular – Área de Superfície de Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) para os compostos de melhor performance na dinâmica molecular;
- Realizar cálculos de teoria do funcional de densidade (DFT) para os compostos mais promissores de acordo com os cálculos de MM-PBSA;
- Aferir as propriedades farmacocinéticas *in silico* dos melhores compostos após os estágios anteriores de triagem.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Inflamação

3.1.1 Aspectos históricos

A cascata inflamatória possui evidências dos seus mais diversos efeitos gravados nos restos mortais de vários animais e seres humanos encontrados através da história, identificados nos ossos de dinossauros, ou mesmo nas múmias egípcias, por estudiosos britânicos que perceberam evidências de placas ateroscleróticas no corpo do rei-faraó Ramsés II, bem como artrite ou espondilite em outros mortos preservados. Este processo biológico nos acompanha desde sempre, e uma das primeiras definições para o que se conhece como inflamação vem do romano Aulus Cornelius Celsus, que definiu seus quatro sintomas principais como rubor, inchaço, febre e dor, e Galeno de Pérgamo nota a formação de pus como uma fase natural do processo da cura de feridas (CAVAILLON, 2021; V. STANKOV, 2012).

3.1.2 Mecanismos fisiológicos e moleculares

Atualmente, definições recentes elaboram muito mais sobre os detalhes dos processos que resultam nestes sintomas observados desde a antiguidade. Apesar de não serem bem esclarecidos tanto o fim quanto o começo do processo inflamatório, pode-se definir inflamação como um espectro de reações agudas ou estados contínuos crônicos de um determinado organismo à estímulos físicos, químicos ou biológicos, internos ou externos, com o propósito de prevenir perturbações da homeostasia, através da perda de função, regulação ou estrutura dos sistemas fisiológicos (GERMOLEC et al., 2018; MEDZHITOV, 2021; V. STANKOV, 2012).

Este caráter difuso dos processos inflamatórios, deve-se às pressões seletivas encontradas durante a evolução dos seres vivos. Nas condições iniciais da seleção natural, a inflamação pode ter sido um traço valioso para a adaptação de um organismo ao seu ambiente, mas como a evolução não necessariamente seleciona soluções otimizadas para problemas encontrados, muitas características que anteriormente eram vitais para a sobrevivência, ou que existem por derivação destas que eram vitais, acabaram tornando-se patológicas no contexto atual (MEDZHITOV, 2008). Assim, muitas doenças inflamatórias crônicas, degenerativas e cardiovasculares, bem como a condição de obesidade, estão atreladas entre si

através da inflamação desregulada, devido ao custo-benefício ter sido afetado pela mudança de ambientes e estilos de vida da espécie humana, afinal, o cenário no qual estas características estavam otimizadas para sobrevivência já não mais existe (OKIN; MEDZHITOV, 2012).

A inflamação é composta por uma cascata de vários processos, envolvendo um grande número de mediadores químicos, células, enzimas e receptores especializados, na qual o primeiro estágio é composto pela presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*) ou a danos celulares (DAMPs – *damage-associated molecular patterns*), moléculas endógenas que sinalizam dano tecidual ou infecção. Estes, por sua vez, são identificados por receptores *Toll-like*, resultando na ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) que migra até o núcleo e altera a expressão gênica da célula, gerando a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1-beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α – *tumor necrosis fator alpha*), dentre outros numerosos sinalizadores (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

São componentes essenciais na iniciação da inflamação os inflamassomos, que são grandes complexos proteicos que comportam os receptores para reconhecimento de padrões moleculares (PRRs – *pattern recognition receptors*), estando estes ligados à caspase-1 por proteínas adaptadoras, sendo estas as proteínas contendo domínio-recrutador-e-ativador-de-caspase associadas à apoptose (ASC – *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*). Os PRRs são responsáveis por detectar PAMPs e DAMPs provenientes tanto de agentes infecciosos como do próprio hospedeiro, e sua ativação desencadeia uma cascata de mudanças conformacionais no complexo proteico, resultando em produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18) (BARNETT et al., 2023; MEZZAROMA; ABBATE; TOLDO, 2021).

Em resposta a estes eventos, diversas células se tornam efetoras da inflamação, incluindo células granulocíticas sanguíneas (neutrófilos, basófilos, eosinófilos), monócitos, macrófagos, mastócitos e linfócitos, que passam a agir no tecido lesionado eliminando as fontes de agressão e removendo os compostos residuais da destruição celular (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; GERMOLEC et al., 2018).

Além disso, mediadores lipídicos são sintetizados a partir de componentes das membranas celulares rompidas em tecidos inflamados: o ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado, que é liberado das membranas pela ação de enzimas fosfolipase e, conseqüentemente, sofre diversas mudanças catalisadas pelas enzimas prostaglandina-sintases ou lipoxigenases. São assim formados os compostos eicosanoides – prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, envolvidos nos mais diversos processos como dor, febre ou agregação plaquetária (BRUNTON; KNOLLMANN; HILAL-DANDAN, 2017; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; RITTER et al., 2014).

Integra também parte da resposta inflamatória o radical livre óxido nítrico (NO), gerado por isoenzimas óxido nítrico sintase (NOS) a partir do substrato *L*-arginina, sendo este um mediador importante por ser ativador da guanilil ciclase solúvel, resultando na formação de GMP cíclico (cGMP), redução da concentração de cálcio intracelular e causando alterações no funcionamento de células musculares lisas, nervosas e do sistema imune, além de ser citotóxico para patógenos (RITTER et al., 2014).

3.1.3 Patologias associadas e importância terapêutica

Tipicamente, a reação inflamatória aguda cessa ao decorrer da morte das células efectoras, subseqüentemente fagocitadas por fagócitos presentes no tecido, juntamente com a participação de mediadores químicos pró-resolutivos que sinalizam o fim da inflamação – lipoxinas, resolvinas, protetinas, maresinas, proteínas induzidas por glicocorticoides, prostaglandina D₂ (PGD₂), interleucina-10 (IL-10), dentre outros. Entretanto, não se identifica em quadros inflamatórios crônicos um momento exato de resolução final, a exemplo de placas ateroscleróticas infiltradas por macrófagos, adipócitos necróticos presentes na obesidade ou mesmo articulações invadidas por linfócitos e monócitos na artrite reumatoide. Esta inflamação não-resolutiva provavelmente deve sua propagação à produção inadequada de mediadores resolutivos, estímulos inflamatórios persistentes, falha na mudança de fenótipo nas populações celulares de macrófagos e linfócitos T ou infiltração por células supressoras derivadas da linhagem mieloide (ALESSANDRI et al., 2013; NATHAN; DING, 2010; RITTER et al., 2014).

Assim, devido ao caráter agressivo, citotóxico e muitas vezes não-resolutivo da reação inflamatória, diversas doenças e distúrbios apresentam evidências do envolvimento destes processos em sua patogênese. Processos inflamatórios persistentes e silenciosos de baixa magnitude, resultantes do reconhecimento de DAMPs gerados a partir de disfunções metabólicas ou danos teciduais causam um quadro de inflamação sistêmica crônica que gera danos colaterais ao organismo através de estresse oxidativo. Esta inflamação sistêmica, possivelmente causada por fatores de risco como obesidade, infecções crônicas, exposição a xenobióticos ou estilos de vida estressantes, está envolvida em processos como síndrome metabólica, diabetes *mellitus* tipo 2, neoplasias, depressão, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e autoimunes (FURMAN et al., 2019).

De maneira geral, estima-se que infecções e reações inflamatórias subclínicas estão associadas a 25% dos casos de câncer, porém já existem ligações bem delineadas de processos inflamatórios resultando em câncer, tais como: colites ulcerativas ou doença de Crohn e câncer colorretal, hepatites ou cirroses e hepatocarcinomas, refluxo crônico e câncer de esôfago, infecção cervical pelo vírus do papiloma humano (HPV) e câncer do colo do útero, infecção por *Helicobacter pylori* e câncer de estômago. Em qualquer tecido onde se instale um quadro inflamatório persistente, as células estão predispostas a alterações em genes relacionados ao câncer ou modificações pós-síntese em proteínas sinalizadoras envolvidas no ciclo de replicação celular (EIRÓ, 2012; JAROENLAPNOPPARAT; BHATIA; COBAN, 2022; TERZIĆ et al., 2010).

Além disso, a inflamação sistêmica, geralmente relacionada a quadros de estresse crônico, pode alterar a integridade da barreira hematoencefálica, causando perda de função das junções entre as células epiteliais que antes impediam células do sistema imune e mediadores químicos da inflamação de penetrar no tecido encefálico, causando neurodegeneração que pode resultar no desenvolvimento ou exacerbação do transtorno da depressão maior ou de doenças neurodegenerativas (CUNNINGHAM, 2013; MEDINA-RODRIGUEZ; BEUREL, 2022; MEHDI et al., 2023).

Estes quadros de inflamação encefálica possuem impactos no sistema endócrino ao desequilibrar o eixo adrenal-hipotalâmico-pituitário, aumentando os níveis de cortisol e, conseqüentemente, a resistência à insulina. Desta forma, fica clara a associação entre processos inflamatórios não-resolutivos e síndromes metabólicas, bem como quadros de dislipidemia e diabetes *mellitus* tipo 2 (MEHDI et al., 2023).

Também integra o quadro das síndromes metabólicas a obesidade, resultante de um desequilíbrio entre a entrada e o consumo de energia da dieta, causando um superávit que se acumula nos tecidos adiposos. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no plasma durante a obesidade foram descobertos, devido a uma resposta do tecido adiposo ao ganho de novos nutrientes: se o aumento do tamanho e número dos adipócitos for considerável, ao ponto de causar hipóxia a estes por redução na perfusão sanguínea do tecido, inicia-se uma cascata inflamatória após a necrose destes adipócitos asfixiados, sendo este estado pró-inflamatório associado a alterações no metabolismo de lipídeos e glicose, aumento da resistência à insulina e hipertensão (CUMMINS; TAYLOR, 2017; ELLULU et al., 2017).

Ademais, doenças cardiovasculares também possuem envolvimento nos estados inflamatórios. A aterosclerose, doença cardiovascular provocada pelo acúmulo de lipídeos em ateromas durante a interação entre células epiteliais e células do sistema imune após lesão do epitélio vascular, está associada com diversas vias de sinalização na inflamação, incluindo os inflamassomos (KONG et al., 2022).

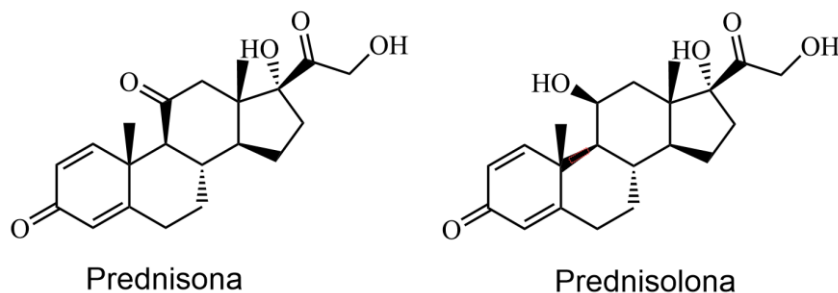
Considerando os efeitos dos tromboxanos produzidos durante a inflamação na hemostasia e coagulação sanguínea, a associação da inflamação com casos de tromboembolia venosa é bem conhecida, sendo esta predisposta por fatores de risco como obesidade, lúpus, processos cirúrgicos ou doenças inflamatórias crônicas (COLLING; TOURDOT; KANTHI, 2021).

Desta forma, torna-se evidente a necessidade de abordagens terapêuticas variadas, capazes de regular a inflamação nos mais diversos pontos da cascata de sinalização.

3.1.4 Terapias farmacológicas convencionais e suas limitações

3.1.4.1 Anti-inflamatórios esteroidais

Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) são análogos ao cortisol, que é um hormônio produzido naturalmente e atua como anti-inflamatório endógeno e modulador de várias funções fisiológicas (ORAY et al., 2016). O padrão ouro dos AIEs corresponde à classe dos glicocorticoides (Figura 2), que reduzem a inflamação e a ativação imunológica em várias doenças, como artrite reumatoide e asma (ORDUÑA-VALLS et al., 2016).

Figura 2 – Fármacos anti-inflamatórios esteroidais.

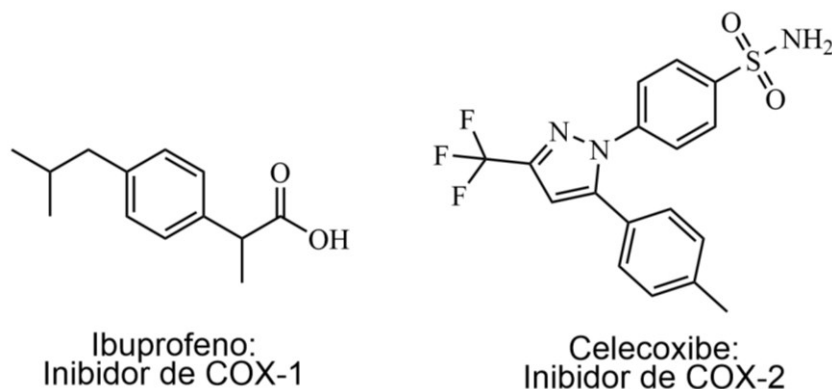
Fonte: PUBCHEM (2023)

Os glicocorticoides alteram o funcionamento normal dos leucócitos, limitando a síntese de mediadores inflamatórios e citocinas responsáveis pela manutenção e potencialização da cascata inflamatória. Seu mecanismo de ação finaliza com a inibição da vasodilatação, diminuição do exsudato celular, inibição da aderência dos neutrófilos na área inflamada e impedimento da liberação de ácido araquidônico, ou seja, impossibilitando a produção de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e prostaciclina (ORDUÑA-VALLS et al., 2016). Sua ação é mais acentuada que os anti-inflamatórios não-esteroidais, mas possuem inúmeros efeitos colaterais, principalmente provocando distúrbios metabólicos e disfunções dos osteoblastos (LIU et al., 2022).

3.1.4.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais

Os Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são um grupo diversificado de compostos aromáticos (Figura 3) que, geralmente, são ácidos ou bases orgânicas fracas, atuando nos alvos da inflamação e bloqueando a ação das cicloxigenases, o que inibe a produção das prostaglandinas. Devido a sua facilidade de acesso, sendo, normalmente, de baixo custo de produção e comercialização, esses fármacos são os mais utilizados no tratamento de inflamações a nível mundial (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020).

Figura 3 – Fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais.



Fonte: PUBCHEM (2023)

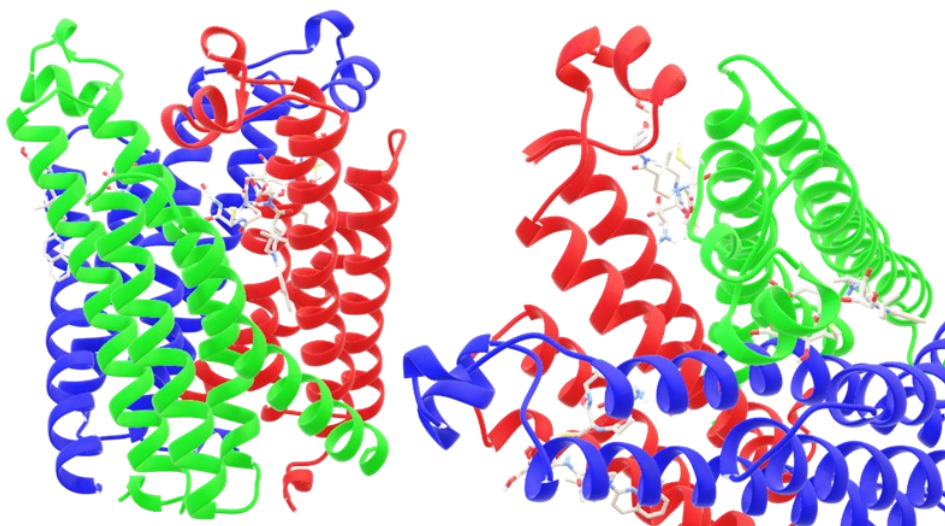
As prostaglandinas e os tromboxanos regulam diversas funções fisiológicas, portanto, a inibição de sua síntese pode afetar o organismo, o que explica a quantidade de efeitos adversos dos AINEs. Estes efeitos se dão por consequência da inibição das diferentes isoenzimas: na via de produção das prostaglandinas, por exemplo, a inibição da COX-1 gera distúrbios gastrointestinais ao reduzir a proteção da mucosa gástrica; já para os inibidores seletivos de COX-2, os “coxibes”, existe maior risco trombótico e cardiovascular devido a uma interferência na síntese plaquetária de tromboxano (MOORE et al., 2019).

3.1.5 Novos alvos terapêuticos promissores

3.1.5.1 Prostaglandina E sintase 1 microssomal (mPGES-1)

A prostaglandina E sintase 1 microssomal (mPGES-1), que pertence à superfamília das proteínas membrana-associadas envolvidas no metabolismo de eicosanoides e glutathione (MAPEG), consiste de um homotrímero (Figura 4) no qual cada monômero possui 152 aminoácidos, massa molecular de 16 kDa e quatro hélices transmembrana em sua estrutura (NASCIMENTO; AQUINO; SILVA JÚNIOR, 2022; ZHANG et al., 2022).

Figura 4 – Estrutura da enzima mPGES-1, destacando seus três sítios ativos.



Fonte: Adaptado de Kuklish (2016).

Entre os três monômeros da mPGES-1, existem três sítios ativos na região que atravessa a membrana plasmática, enquanto domínios citoplasmáticos compostos cada um por vinte resíduos carregados positivamente conectam as hélices transmembrana. Seu cofator essencial, a glutathiona (GSH), encontra-se em conformação similar à letra “U” em cada um dos sítios ativos. Pode ser inferido pela estrutura tridimensional que seu substrato, a prostaglandina H₂ (PGH₂), liga-se ao sítio ativo através dos resíduos Arg⁵², Ala¹³⁸, Leu¹³⁵, Thr¹³¹ e His⁵³. Seu mecanismo catalítico envolve a desprotonação da GSH, estabilização do grupo tiol deste cofator pelos resíduos Ser¹²⁷ e Arg¹²⁶ e reação do grupo tiolato recém-formado com a PGH₂, resultando na formação de prostaglandina E₂ (PGE₂) (NASCIMENTO; AQUINO; SILVA JÚNIOR, 2022; SILVA, 2024).

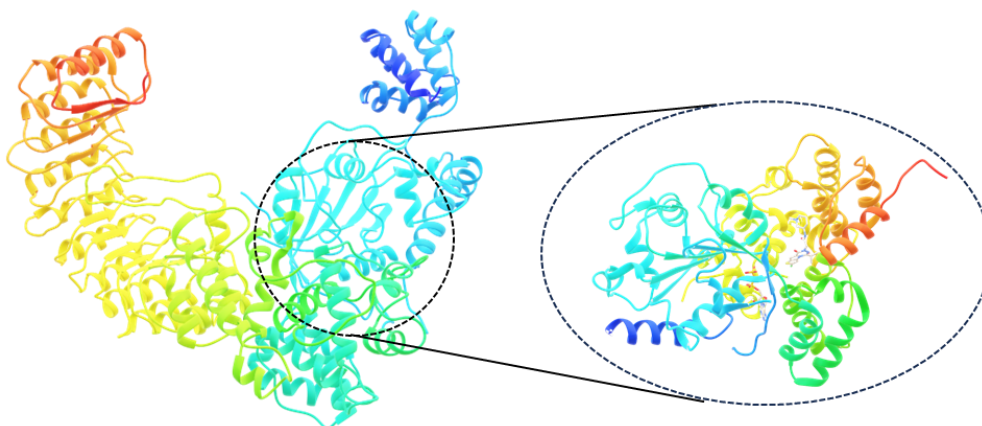
O produto desta reação, PGE₂, está envolvido na regulação da pressão arterial, doenças autoimunes e diversos tipos de tumores, incluindo cânceres de cólon, próstata, pulmão e mama (LARSSON; JAKOBSSON, 2015), bem como no desenvolvimento do diabetes, artrite reumatoide e aterosclerose (ZHANG et al., 2022). A expressão elevada da mPGES-1 é encontrada também nas doenças do sistema nervoso, onde PGE₂ media a ativação de células da glia, secreção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da sinalização glutaminérgica causando excitotoxicidade, desregulação da barreira hematoencefálica e, por fim, desencadeia efeitos promotores de tumor (SLUTER et al., 2023). Como a mPGES-1 participa de um estágio posterior à ação das enzimas cicloxigenase-1 e cicloxigenase-2, sua inibição seletiva elimina uma parte do processo inflamatório ao mesmo tempo que evita a

ocorrência dos efeitos colaterais associados com a interrupção da função constitutiva destas enzimas (BERGQVIST; MORGENSTERN; JAKOBSSON, 2020).

3.1.5.2 Inflamassomo contendo o receptor proteína com domínios NACHT, rico em repetição de leucinas e pirina 3 (NLRP3)

A estrutura do inflamassomo NLRP3 é bem conhecida, constituída da proteína sensora com domínios *NACHT*, rico em repetição de leucinas e pirina 3 (NLRP3), a proteína adaptadora associada à apoptose *speck-like* contendo domínio *CARD* (ASC) e a proteína efetora caspase-1. Por sua vez, o receptor NLRP3 em si é constituído por três domínios, sendo estes o domínio N-terminal pirina, o domínio C-terminal rico em repetição de leucinas e o domínio *NACHT* (Figura 5), localizado entre os dois anteriores (QUE et al., 2024).

Figura 5 – Estrutura do receptor NLRP3, destacando o domínio *NACHT*.



Fonte: Adaptado de Hochheiser (2022) e Velcicky (2024).

Neste inflamassomo, sua ativação começa em uma fase de preparação (*priming*), na qual ocorre o reconhecimento dos padrões moleculares relacionados a danos ou patógenos ou de citocinas pró-inflamatórias, prosseguindo para a fase de ativação. O domínio *NACHT* possui a habilidade de captar nucleotídeos e hidrolisar ATP para que ocorra o recrutamento da proteína ASC. Esta proteína, por sua vez, interage com o NLRP3, gerando filamentos nucleados que formam uma plataforma com os domínios *CARD* para recrutar a proteína efetora caspase-1. Uma vez que é recrutada pelo inflamassomo, a caspase-1 se auto-cliva para ser então ativada e causar a ativação de citocinas pró-inflamatórias da família interleucina-1 (IL-1), bem

como ativar a gasdermina D, responsável pelo processo de piroptose (FU; WU, 2023; KELLEY et al., 2019).

A função do inflamassomo NLRP3 pode ser desregulada por diversos estímulos, bem como causar variados efeitos deletérios. Por exemplo, a exposição a partículas de sílica e amianto podem exacerbar sua ativação, causando silicose ou asbestose, respectivamente, além de estar envolvido na patologia da osteoartrite devido à sua ativação por cristais de hidroxipatita (WANG et al., 2020b). Além disso, na progressão da doença de Alzheimer, a ativação do inflamassomo induz a hiperfosforilação e consequente aglomeração de proteínas *tau*, por meio de *tau*-quinases que dependem da ação da interleucina-1 β produzida pelo NLRP3 (ISING et al., 2019).

Atualmente, entende-se que a inibição do receptor NLRP3 acontece graças à interrupção de uma ponte salina entre os resíduos Arg³⁵¹ e Glu⁶²⁹ simultaneamente à formação de uma ligação mais potente entre o inibidor e o resíduo Arg⁵⁷⁸, causando a estabilização de sua conformação inativa e impedindo a entrada dos nucleotídeos necessários para a ação do sensor, por causa da conformação fechada do sítio ativo no domínio *NACHT* (COLL et al., 2019; DEKKER et al., 2021; TAPIA-ABELLÁN et al., 2019).

3.2 Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computador (CADD)

Dentre as ferramentas disponíveis neste campo de estudo, existem técnicas com enfoque em diferentes segmentos. Os métodos baseados apenas em propriedades físico-químicas e biológicas dos ligantes são denominados como planejamento de fármacos baseado no ligante (LBDD – *ligand-based drug design*), dentre os quais estão modelagem de farmacóforo, a triagem virtual baseada em fragmentos químicos, e a relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR – *quantitative structure-activity relationship*), sucedida pelos modelos de inteligência artificial e aprendizado de máquina, estes fundamentados nos descritores quantitativos formulados pelo QSAR (ABDOLMALEKI; GHASEMI; GHASEMI, 2017).

Em contrapartida, métodos centrados no estudo da bioquímica estrutural de alvos terapêuticos e nas interações intermoleculares destes com seus inibidores são descritos como planejamento de fármacos baseado na estrutura (SBDD – *structure-based drug design*), incluindo nestes os algoritmos de ancoragem molecular,

simulações de dinâmica molecular baseada em mecânica molecular, cálculos de área de superfície de Poisson-Boltzmann (PBSA – *Poisson-Boltzmann Surface Area*), e cálculos quânticos de teoria do funcional de densidade eletrônica (DFT – *density functional theory*) (ABDOLMALEKI; GHASEMI; GHASEMI, 2017; NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR, 2022b). Esta gama de técnicas computacionais permite aos pesquisadores a composição de modelos computacionais para identificar novos compostos químicos promissores mediante uso de ferramentas virtuais para construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos, possibilitando maior precisão, maior velocidade e menores custos (BARREIRO et al., 1997).

3.2.1 Ancoragem molecular

No uso dos algoritmos de ancoragem molecular, busca-se descobrir novos ligantes com afinidade para os alvos ao calcular seu modo de interação com os resíduos do sítio ativo, sendo obtidas conformações do ligante inserido na cavidade da macromolécula onde haja baixa energia livre de ligação e nenhum impedimento estérico. Todavia, este método possui limitações ao tratar a proteína como um objeto rígido para limitar o tempo de processamento computacional (FERRARA et al., 2006).

O método de ancoragem tem demonstrado ser incrivelmente versátil. Sua aplicação na triagem virtual de grandes números de compostos tem faces diversas: determinar atividades biológicas para um alvo; identificar determinantes estruturais para a ligação em um receptor; prever efeitos colaterais, ao identificar a ligação de um composto em alvos indesejados; detectar compostos capazes de atuar em múltiplos alvos simultaneamente; avaliar o desempenho de fármacos já presentes no mercado em alvos diferentes das suas indicações terapêuticas previstas (PINZI; RASTELLI, 2019).

Existe atualmente uma imensa gama de estruturas cristalográficas, com ou sem inibidores co-cristalizados, armazenadas em bases de dados publicamente disponíveis para uso nos estudos de ancoragem, a exemplo do *Protein Data Bank*. Ademais, pequenas moléculas isoladas também possuem bancos de dados públicos, como o *PubChem* ou o *ZINC*, tornando o processo de triagem virtual acessível e com alto custo-benefício (SONG; LIM; TONG, 2009).

3.2.2 Simulações de dinâmica molecular

Por sua vez, as técnicas de simulação por dinâmica molecular buscam complementar estas limitações encontradas na ancoragem, ao calcular as interações entre moléculas pequenas e macromoléculas ao longo do tempo, baseando-se em equações de mecânica newtoniana e abstraindo a influência dos efeitos eletrostáticos em valores pré-definidos, compilados em um campo de força, sendo possível observar alterações conformacionais nestas moléculas em determinadas condições de pressão e temperatura (FELTES; VERLI, 2014).

Esta técnica é bastante custo-eficiente para a avaliação do desempenho de ligantes previstos para ter atividade biológica em outras técnicas como QSAR ou ancoragem molecular, por ser capaz de identificar relações estrutura-função, estabilidade, mobilidade e afinidade de ligação em macromoléculas modeladas, além de produzir dados para cálculos como os de energia livre de ligação (KAUR; KHATIK, 2020). No entanto, inclui algumas limitações como a os valores inerentemente aproximados dos campos de força que geram menor exatidão, a impossibilidade de modelar corretamente a formação ou quebra de ligações covalentes, a dependência da disponibilidade de estruturas tridimensionais experimentais ou homólogas fiéis a realidade e, finalmente, a grande escala de tempo necessária para simulações em escalas de tempo compatíveis com a duração de processos biomoleculares (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

3.2.2.1 Cálculos de energia livre de ligação por Mecânica Molecular com Área de Superfície Poisson-Boltzmann (MM-PBSA)

Na técnica da área de superfície de Poisson-Boltzmann com mecânica molecular (MM/PBSA – *Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*), será obtido um valor mais exato para a energia livre de ligação do inibidor em seu alvo quando calculados os valores da energia livre de Gibbs, considerando as interações eletrostáticas e de Van der Waals detectadas durante a trajetória de uma simulação de dinâmica molecular, pela subtração da energia livre da proteína não-ligada e do ligante isolados à energia livre do complexo proteína-ligante (GENHEDEN; RYDE, 2015a; MILLER et al., 2012).

As vantagens da integração deste cálculo no planejamento de fármacos incluem custos computacionais reduzidos para obter resultados mais sofisticados que as funções de ranqueamento comumente aplicadas na ancoragem molecular por incluir contribuições energéticas que não seriam previstas, como a energia livre de solvatação, permitindo que grandes ambientes químicos sejam classificados com maior exatidão durante triagens virtuais (HOMEYER; GOHLKE, 2012).

Entretanto, este método costuma ter seus resultados afetados por limitações na predição de valores de entropia, na aferição das contribuições energéticas atribuídas à mudanças conformacionais do alvo, na avaliação da contribuição de moléculas de água estruturais dos sítios ativos, na escolha dos parâmetros e dos campos de força, bem como no cálculo da energia livre de solvatação de grupos polares ou carregados eletrostaticamente, especialmente se estes se encontram no interior de biomacromoléculas (GENHEDEN; RYDE, 2015b; HOMEYER; GOHLKE, 2012).

3.2.3 Teoria do funcional de densidade (DFT)

Os cálculos de teoria do funcional de densidade eletrônica (DFT – *density functional theory*) podem oferecer informações sobre orbitais moleculares e geometria molecular com maior exatidão, por considerar os efeitos da densidade eletrônica na conformação das moléculas, a partir de cálculos derivados da função de onda de Schrödinger, equação fundamental da química quântica (SHOLL; STECKEL, 2009).

A teoria do funcional de densidade pode ser aplicada isoladamente em moléculas potencialmente bioativas a fim de determinar propriedades dependentes da distribuição eletrônica nos orbitais: possíveis conformações mais estáveis, orbitais moleculares mais altos ocupados (HOMO – *highest occupied molecular orbital*) e mais baixos desocupados (LUMO – *lowest occupied molecular orbital*), potenciais eletrostáticos e, conseqüentemente, reatividade e estabilidade. Apesar de ser um método altamente preciso, os resultados dos cálculos dependem dos funcionais e *basis sets* utilizados, além de possuírem aplicabilidade muito limitada a sistemas macromoleculares devido ao seu alto custo computacional de processamento (YE; YANG; LIU, 2022).

3.2.4 Métodos *in silico* de predição da viabilidade farmacocinética

Abordagens quimioinformáticas para predição de características biológicas de determinados compostos têm sido bastante populares nos anos mais recentes, iniciando-se com as primeiras técnicas de QSAR e, atualmente, baseando-se na aplicação de algoritmos de aprendizado de máquina sofisticados, capazes de prever propriedades em um espaço químico muito mais amplo do que os antigos algoritmos de QSAR (MITCHELL B.O., 2014).

Ambas as técnicas possuem o mesmo propósito: ao analisar estruturas representativas e *scaffolds* de vários compostos bioativos, alguns padrões estruturais relacionados a características biológicas importantes destacam-se para os pesquisadores, acelerando os esforços de pesquisa. Entretanto, estes métodos podem sofrer com inexatidão caso os bancos de dados de moléculas *drug-like* não sejam amplos o suficiente, ou se existirem dados incorretos inseridos (BECHELLI; DELHOMMELLE, 2024; TIAN et al., 2015).

As propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, bem como algumas propriedades físico-químicas intrínsecas da estrutura química, são favoritas para a modelagem baseada em modelos de ML, devido ao fato de que estas propriedades não são facilmente modeladas por modelos de mecânica molecular ou quântica (MITCHELL B.O., 2014).

4 METODOLOGIA

4.1 Planejamento dos análogos isatínicos-hidrazônicos

Foram planejados 54 derivados a partir do composto (3*E*)-1-(2-anilinoacetil)-3-(metilideno-hidrazinilideno)indolin-2-ona e identificados pela sigla LZG, associada a um número formado pela combinação de dois dígitos simbolizando cada grupo substituinte presente na estrutura (Quadro 1). De acordo com a disponibilidade de reagentes para futura síntese, estas 54 combinações de novos derivados foram exploradas para analisar adequadamente o espaço químico acessível ao grupo de pesquisa, mantendo um equilíbrio entre variabilidade estrutural e viabilidade computacional. Estes foram, então, encaminhados para planejamento de fármacos baseado na estrutura (SBDD) através de triagem por métodos de modelagem molecular detalhados a seguir.

Quadro 1 – Planejamento de novos derivados para a série LZG

LZG-00[R]	LZG-06[R]	R, R'	
		1	
		2	
		3	
		4	
		5	
		6	
LZG-07[R]	LZG-08[R]		

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.2 Triagem dos compostos por ancoragem molecular

Foram selecionadas estruturas tridimensionais cristalográficas dos alvos mPGES-1 e NLRP3 a partir do *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (RCSB PDB) (Berman, 2000) para triagem *in silico* da atividade através de ancoragem molecular. Utilizando o *UniProt* (BATEMAN et al., 2023) como ferramenta de busca nesta base de dados, foram selecionadas estruturas obtidas a partir do genoma humano e com 90% ou mais dos resíduos em regiões permitidas, demonstradas em gráfico de Ramachandran obtido através do *webservice SAVES-PROCHECK* (FUREY et al., 2006; LASKOWSKI et al., 1993).

Os compostos planejados previamente descritos foram desenhados e submetidos à análise conformacional através do *software MarvinSketch®* (CHEMAXON, 2022), onde para cada ligante foi gerada a conformação de menor valor energético dentre dez tentativas. Esta conformação foi, então, encaminhada para minimização de energia a fim de corrigir os ângulos e comprimentos das ligações por meio do *software ORCA®* (NEESE, 2012, 2022), empregando o método semiempírico PM3 (*Parametric Method 3*).

As triagens virtuais por ancoragem molecular foram realizadas mediante uso do *software GOLD®* (JONES et al., 1997; VERDONK et al., 2003), utilizando o algoritmo *ChemPLP* para cálculo da melhor conformação dos ligantes dentro do sítio ativo para cada alvo. Todos os hidrogênios foram adicionados à estrutura dos alvos. Centrada na posição do inibidor original, foi selecionada uma área de 6 Å (angstroms), removendo então os ligantes co-cristalizados e submetendo estes à re-ancoragem usando o algoritmo genético (GA – *genetic algorithm*) do *software* em sua eficiência máxima, a fim de validar o método de triagem. Por fim, dez poses de ligação foram geradas para cada ligante, e aquelas com maior valor de *fitness score* foram escolhidas para as demais análises.

No caso da enzima mPGES-1, por sua estrutura trimérica apresentar 3 cavidades contendo sítios ativos (NASCIMENTO; AQUINO; SILVA JÚNIOR, 2022), a ancoragem foi realizada em todas as cavidades e a média dos valores de RMSD foi utilizada para validação do método, bem como a média dos valores de fitscore como parâmetro de atividade, a fim de considerar as variações conformacionais do ligante co-cristalizado como um todo. O grupo de compostos previamente minimizados foi então encaminhado para a triagem pela mesma metodologia validada durante a re-ancoragem.

Para os melhores compostos na triagem, foram obtidas as poses de melhor pontuação para cada análogo ao exportar os complexos proteína-ligante com maior *fitness score* para o software *BIOVIA Discovery Studio*® (BIOVIA DASSAULT SYSTEMES, 2005). Foi possível analisar visualmente as interações promovidas entre o ligante e o sítio ativo através de diagramas 2D produzidos pelo programa, e avaliar se ocorrem interações com resíduos essenciais para atividade. Adicionalmente, o UCSF *Chimera*® (PETTERSEN et al., 2004) foi usado para gerar figuras tridimensionais a partir dos complexos exportados. Neste caso, os compostos com as interações mais promissoras com estes resíduos-chave foram selecionados para prosseguimento do estudo.

4.3 Simulações de dinâmica molecular

Os complexos proteína-ligante foram preparados nos *softwares* UCSF *Chimera*® e *GROMACS*® (ABRAHAM et al., 2015) para execução das simulações de dinâmica molecular no ambiente *Lovelace* do Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAD-SP). Todos os hidrogênios foram adicionados à macromolécula e ao ligante para que pudessem ser geradas as topologias destes, confinadas em caixas triclínicas de 1.0 nm contendo solvente aquoso e íons Na⁺ e Cl⁻ à concentração de 0.15 M.

Foi atribuído o campo de força CHARMM36 (BROOKS et al., 1983) para simular as interações intermoleculares. A parametrização da molécula do ligante para inserção na topologia compatível com este campo de força foi realizada com auxílio do *webservice SwissParam* (ZOETE et al., 2011). Foi então minimizada a energia dos sistemas, para que posteriormente tenham sido alcançados os equilíbrios de número constante de partículas, volume e temperatura (NVT) bem como de número constante de partículas, pressão e temperatura (NPT), a uma temperatura de 300 K durante 10 ns. Foram estudados os comportamentos dos complexos proteína-ligante durante a simulação de dinâmica molecular por 100 ns à 300 K, comparados com o comportamento das proteínas sem ligantes.

O método descrito anteriormente está em concordância com protocolos já utilizados, validados e publicados por nosso grupo de pesquisa (ALBINO et al., 2023; MENEZES et al., 2024; NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR, 2022a). Adicionalmente, para mPGES-1, apesar da ancoragem ter sido feita nas três

cavidades, foram utilizados complexos onde o ligante ocupa apenas a cavidade entre as cadeias polipeptídicas A e B, devido à função catalítica ser executada por apenas uma das cavidades por vez (HE et al., 2011).

Foram gerados gráficos pelo *software Grace*® (GRACE DEVELOPMENT TEAM, 1998) para avaliar a estabilidade dos complexos alvo-ligante em comparação com a proteína livre, utilizando os dados de desvio quadrático médio da raiz (RMSD – *root mean square deviation*), raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF – *root mean square fluctuation*), raio de rotação (Rg – *radius of gyration*), área de superfície acessível pelo solvente (SASA – *solvent-accessible surface area*) e ligações de hidrogênio ligante-alvo calculados a partir das trajetórias atômicas durante o tempo da simulação. Figuras dos complexos no início e fim das simulações foram geradas com a ferramenta *MD Movie* do *Chimera*®, nas quais é possível inspecionar visualmente as mudanças de conformação e posição da macromolécula e do ligante.

4.3.1 Cálculos de Energia Livre de Ligação por MM/PBSA

Foi calculada a energia livre de ligação dos compostos ($\Delta G_{\text{LIGAÇÃO}}$) e seus componentes energéticos através dos cálculos de MM/PBSA, que foram realizados usando a ferramenta *gmx_mmpbsa* (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021), a partir da trajetória obtida após a simulação de dinâmica molecular previamente realizada no *software GROMACS*®.

A energia livre de ligação neste algoritmo é estimada através do cálculo da variação de entalpia e do fator entrópico após um ciclo termodinâmico envolvendo ligantes e alvos separadamente, assim como enquanto complexados entre si (Equação 1) (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021). Os valores de entropia foram estimados usando análise de modo-normal (BROOKS; KARPLUS, 1983). A entalpia de ligação (ΔH) é composta por dois fatores (Equação 2). ΔE_{MM} corresponde às mudanças de energia mecânica e inclui o termo $\Delta E_{\text{NÃO-LIGADO}}$, responsável por incluir as contribuições energéticas das interações de van der Waals (ΔE_{VDW}) e das interações eletrostáticas (ΔE_{ELE}) (Equação 3). Neste algoritmo, ΔE_{ELE} e ΔE_{VDW} foram calculados pelo campo de força AMBER99SB (HORNAK et al., 2006). Já a energia livre de solvatação (ΔG_{SOL}) compreende seus componentes energéticos polares (ΔG_{POLAR}), obtidos pelos cálculos de Poisson-Boltzmann (WANG et al., 2012), bem como seus componentes não polares ($\Delta G_{\text{NÃO-POLAR}}$) (Equação 4). O componente

energético não polar da energia livre de solvatação ($\Delta G_{N\tilde{A}O-POLAR}$) é obtido a partir de termos energéticos para dispersão ($\Delta G_{DISPERS\tilde{A}O}$) e para a superfície da cavidade do sítio ativo ($\Delta G_{CAVIDADE}$), decompostos em um modelo de solvatação implícito (Equação 5) que, dentre outros fatores, leva em conta a variação da área de superfície acessível a solvente (ΔS_{ASA}) (FLORIS; TOMASI, 1989; TAN; TAN; LUO, 2007).

$$\Delta G_{LIG} = (G_{CPX}) - (G_{REC}) - (G_{LIG}) = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 1})$$

$$\Delta H = \Delta E_{MM} + \Delta G_{SOL} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{LIGADO} + \Delta E_{N\tilde{A}O-LIGADO} = (\Delta E_{LIGA\tilde{C}\tilde{A}O} + \Delta E_{\hat{A}NGULO} + \Delta E_{DIEDRO}) + (\Delta E_{ELE} + \Delta E_{VDW}) \quad (\text{Equação 3})$$

$$\Delta G_{SOL} = \Delta G_{POLAR} + \Delta G_{N\tilde{A}O-POLAR} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{N\tilde{A}O-POLAR} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\Delta G_{N\tilde{A}O-POLAR} = \Delta G_{DISPERS\tilde{A}O} + \Delta G_{CAVIDADE} = \Delta G_{DISPERS\tilde{A}O} + (CVD_{TENS\tilde{A}O} \times \Delta S_{ASA} + CVD_{DESVIO}) \quad (\text{Equação 5})$$

Portanto, além dos valores absolutos de energia livre de ligação, os componentes energéticos contribuintes foram obtidos, dentre os quais estão as interações de Van der Waals (ΔE_{VDW}) e interações eletrostáticas (ΔE_{ELE}), bem como os componentes polar (ΔG_{POLAR}) e não polar ($\Delta G_{N\tilde{A}O-POLAR}$) da energia livre de solvatação (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021).

4.4 Cálculos de teoria do funcional de densidade (DFT)

Foram realizados os cálculos de DFT aplicando o *software* ORCA®, utilizando o funcional B3LYP e o conjunto de base 6-311G. Os resultados foram analisados através da interface gráfica fornecida pelo *software* Avogadro® (HANWELL et al., 2012). A geometria dos compostos foi determinada a partir de sua melhor conformação, exportada após a ancoragem molecular, sendo determinados os orbitais moleculares de mais alta energia ocupado (HOMO) e de mais baixa energia desocupado (LUMO), bem como diferença de energia entre estes orbitais, momento de dipolo (D), potencial de ionização (IP) (Equação 6) e afinidade eletrônica (EA) (Equação 7) (ZARE et al., 2024) para os compostos estudados.

$$IP = -E_{HOMO} \quad (\text{Equação 6})$$

$$EA = -E_{LUMO}$$

(Equação 7)

4.5 Avaliação das propriedades farmacocinéticas *in silico*

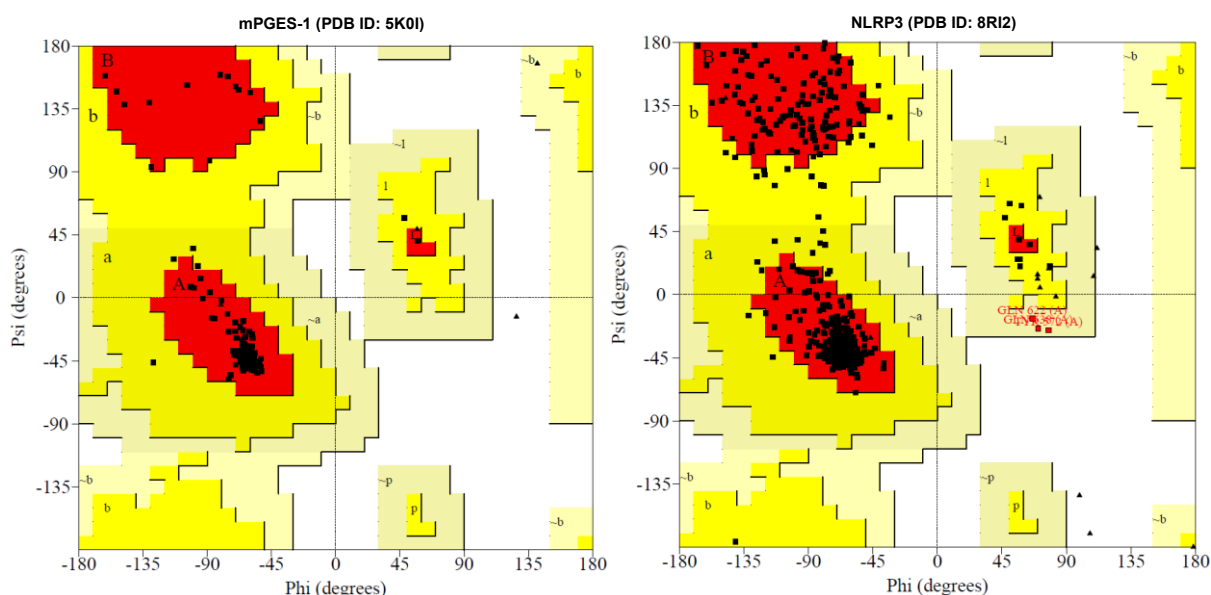
Os compostos mais promissores foram avaliados quanto ao seu perfil farmacocinético e de toxicidade (ADMET – *absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*) previsto através do *web service* SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017), sendo este capaz de calcular propriedades físico-químicas básicas como logP, solubilidade em água ou área de superfície polar, bem como utilizar modelos de aprendizagem de máquina (ML – *machine learning*) treinados para associar atributos moleculares quantitativos com propriedades como absorção intestinal e inibição potencial de isoenzimas do citocromo P450 ou glicoproteína-P (BECHELLI; DELHOMMELLE, 2024).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação das estruturas cristalográficas utilizadas para modelagem molecular

Estruturas cristalográficas dos alvos humanos mPGES-1 (PDB ID: 5K0I) (KUKLISH et al., 2016) e NLRP3 (PDB ID: 8RI2) (VELCICKY et al., 2024) foram selecionadas e avaliadas a partir de seus gráficos de Ramachandran (Figura 6). A maioria dos resíduos de aminoácidos dos alvos estudados foram encontrados nas regiões mais favoráveis, sendo 96,1% e 91,6% para mPGES-1 e NLRP3 respectivamente, enquanto 3,9% e 7,7%, para mPGES-1 e NLRP3 respectivamente, estão em regiões adicionalmente favoráveis. Apesar do NLRP3 ainda apresentar 0,7% dos resíduos em posições menos favoráveis, as estruturas dos alvos mPGES-1 e NLRP3 são consideradas aceitáveis por apresentarem mais de 90% dos resíduos nas posições mais favoráveis (LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 2012), validando o uso destas estruturas para modelagem (Quadro 2).

Figura 6 – Gráficos de Ramachandran para as estruturas cristalográficas.



Fonte: SAVES-PROCHECK (2024)

Quadro 2 – Validação da qualidade das estruturas cristalográficas.

mPGES-1 (PDB ID: 5K0I)	
Resíduos nas regiões mais favoráveis	96.1%
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas	3.9%
Resíduos em regiões generosamente permitidas	0.0%
Resíduos em regiões não permitidas	0.0%
NLRP3 (PDB ID: 8RI2)	
Resíduos nas regiões mais favoráveis	91.6%

Resíduos em regiões adicionalmente permitidas	7.7%
Resíduos em regiões generosamente permitidas	0.7%
Resíduos em regiões não permitidas	0.0%

Fonte: SAVES-PROCHECK (2024)

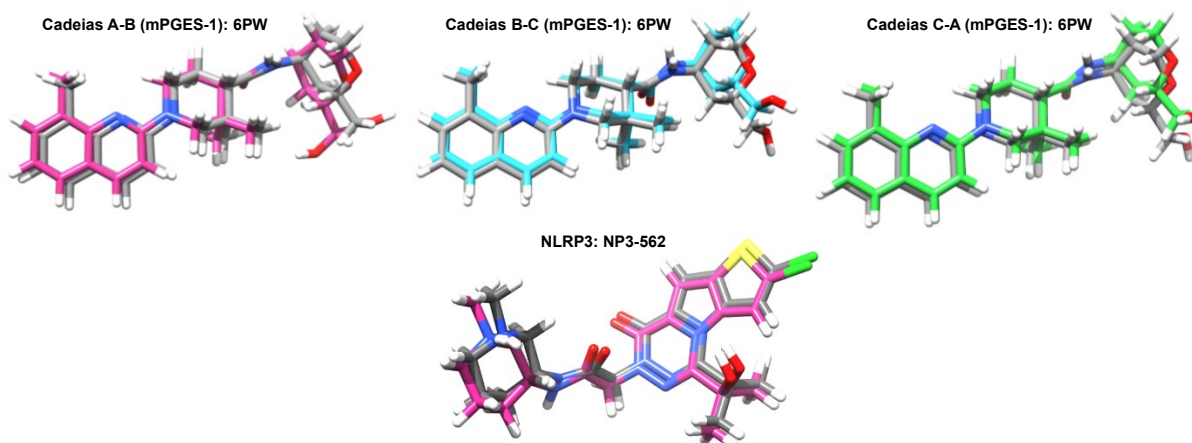
5.2 Ancoragem molecular

5.2.1 Validação do método e avaliação dos resultados

A metodologia de ancoragem molecular foi considerada válida ao alcançar valores de RMSD menores que 2 Å para a conformação mais estável do ligante co-cristalizado em ambas as estruturas cristalográficas utilizadas (Quadro 3) (HEVENER et al., 2009). É considerada como limiar de potencial atividade anti-inflamatória a obtenção de valores de *fitness score* iguais ou superiores ao obtido para o ligante co-cristalizado da estrutura original, sabendo que este é atribuído pelo *software* para atestar a qualidade da conformação do inibidor conhecido (JONES et al., 1997; VERDONK et al., 2003).

É possível avaliar a fidelidade do algoritmo de ancoragem na reprodução de resultados empíricos ao observar a semelhança das poses dos compostos reancorados às poses encontradas experimentalmente na estrutura original (Figura 7). Além disso, pode ser observado que os compostos ancorados se ligam ao sítio ativo de maneira semelhante entre si, no qual todos realizam interações intermoleculares com os resíduos destacados na cor verde (Figuras 8 e 11), corroborando a qualidade do método de ancoragem.

Figura 7 – Visualização tridimensional das poses originais e reancoradas para os inibidores em cada alvo.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Notas: Poses originais (cinza), poses reancoradas (magenta, ciano, verde).

Infelizmente, em um primeiro momento, a grande maioria dos compostos não teve performance melhor do que os ligantes originais para cada alvo. Apenas LZG-065 e LZG-085 superaram o *fitscore* do inibidor NP3-562 no alvo NLRP3, e nenhum composto superou a pontuação do inibidor 6PW no alvo mPGES-1. (Quadro 3). Todavia, a análise das interações intermoleculares apresentadas entre estes compostos e os alvos nos quais estão ancorados podem fornecer informações adicionais sobre o comportamento destes compostos para cada alvo, para além do ranqueamento designado pela função de pontuação.

Quadro 3 – Validação do método de ancoragem molecular e resultados.

mPGES-1 (PDB ID: 5K0I)		NLRP3 (PDB ID: 8RI2)	
RMSD (Å) (média)	0.803	RMSD (Å)	0.474
Fitscore do Ligante Co-cristalizado (média)	83.5	Fitscore do Ligante Co-cristalizado	76.16
Melhores Ligantes	Fitscore Obtido (média)	Melhores Ligantes	Fitscore Obtido
LZG-042	81.25	LZG-065	84.31
LZG-085	79.54	LZG-085	82.94
LZG-065	79.44	LZG-046	76.14
LZG-083	79.33	LZG-042	70.46
LZG-046	75.82	LZG-083	69.76

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

5.2.1.1 Interações intermoleculares previstas com o alvo mPGES-1 (PDB ID: 5K0I)

De acordo com a literatura, na enzima mPGES-1, o substrato se liga ao sítio ativo através de interações com os resíduos Arg⁵², Ala¹³⁸, Leu¹³⁵, Thr¹³¹ e His⁵³, enquanto o mecanismo catalítico envolve Ser¹²⁷ e Arg¹²⁶. Além disso, compostos com atividade inibitória de mPGES-1 conhecida exibiram interações frequentes com os resíduos Leu⁸⁵, Pro⁸¹, Gln¹³⁴, Cys¹³⁷, Ala¹³⁸ e Ala¹⁴¹ em complexos estáveis com este alvo em simulações de dinâmica molecular (NASCIMENTO; AQUINO; SILVA JÚNIOR, 2022; SILVA, 2023).

Na mPGES-1, em quantidade bruta de interações, todos os compostos realizam um número de interações igual ou maior ao inibidor 6PW, com LZG-085 alcançando o maior número ao fazer 13 interações simultâneas com o alvo. Todos realizam mais interações eletrostáticas comparados a 6PW, com LZG-042 realizando o maior número destas (Quadro 4, Figura 10). Nas interações com os resíduos catalíticos,

quase todos os compostos interagem com Ser¹²⁷, com exceção de LZG-046 (Quadro 4, Figura 10). Para Arg¹²⁶, por outro lado, apenas LZG-042 não interage com este resíduo, apesar deste composto ser o único previsto para interagir com todos os resíduos responsáveis pela ligação do substrato com o sítio ativo (Quadro 4, Figura 10). Mesmo assim, LZG-085 realiza o maior número de interações com os resíduos indicados para estabilização do complexo com mPGES-1 (Quadro 4, Figura 10).

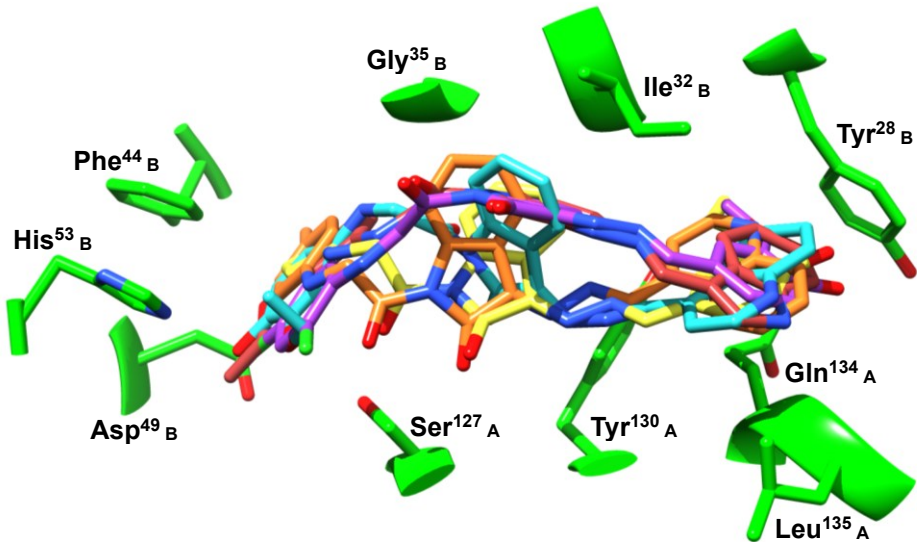
Quadro 4 – Interações intermoleculares entre compostos e resíduos de aminoácido na enzima mPGES-1.

LIGANTE	RESÍDUOS	TIPO DE INTERAÇÃO
6PW	Gln ³⁶ , Arg ³⁸ , Phe ⁴⁴ , Asp ⁴⁹ , Arg ⁵² , Pro ¹²⁴ , Arg ¹²⁶ , Ser ¹²⁷ , Gln ¹³⁴ , Leu ¹³⁵ , Ala ¹³⁸	Van der Waals
	His ⁵³ , Glutathiona	Ligação de Hidrogênio
	Gly ³⁵ , Thr ¹³¹	Ligação Carbono-Hidrogênio
	Tyr ²⁸	Empilhamento π - π em forma de T
	Ala ³¹ , Ile ³² , Leu ³⁹ , Tyr ¹³⁰	Alquil ou π -Alquil
LZG-042	Thr ³⁴ , Gly ³⁵ , Leu ³⁹ , Asn ⁴⁶ , Asp ⁴⁹ , His ⁵³ , Thr ⁷⁸ , Leu ¹³⁵	Van der Waals
	Ser ¹²⁷ , Thr ¹³¹ , Gln ¹³⁴	Ligação de Hidrogênio
	Arg ³⁸	Ligação Carbono-Hidrogênio
	Arg ¹²⁶	π -Cátion
	Glutathiona	π -Enxofre
	Tyr ¹³⁰	Empilhamento π - π em forma de T
	Tyr ²⁸ , Ala ³¹ , Ile ³² , Phe ⁴⁴	Alquil ou π -Alquil
LZG-046	Gly ³⁵ , Phe ⁴⁴ , Asp ⁴⁹ , Arg ⁵² , Thr ⁷⁸ , Ala ¹²³ , Pro ¹²⁴ , Ser ¹²⁷ , Tyr ¹³⁰ , Leu ¹³⁵ , Cys ¹³⁷ , Glutathiona	Van der Waals
	Gln ³⁶ , Gln ¹³⁴	Ligação de Hidrogênio
	Tyr ²⁸	Ligação Carbono-Hidrogênio
	Ile ³²	π -Sigma
	Ala ³¹ , Ile ³² , Leu ³⁹ , His ⁵³ , Ala ¹³⁸	Alquil ou π -Alquil
LZG-065	Gly ³⁵ , Leu ³⁹ , Phe ⁴⁴ , Asn ⁴⁶ , Arg ⁵² , Ala ¹²³ , Ser ¹²⁷ , Tyr ¹³⁰ , Thr ¹³¹ , Gln ¹³⁴ , Leu ¹³⁵ , Cys ¹³⁷	Van der Waals
	Gln ³⁶ , Asp ⁴⁹	Ligação de Hidrogênio
	His ⁵³	Ligação Carbono-Hidrogênio
	Arg ¹²⁶	Ligação de Hidrogênio Desfavorável (Doador-Doador)
	Glutathiona	π -Enxofre
	Tyr ²⁸	Empilhamento π - π em forma de T
	Ala ³¹ , Ile ³² , Arg ³⁸ , Ala ¹³⁸	π -Alquil
LZG-083	Ala ³¹ , Gly ³⁵ , Gln ³⁶ , Ala ⁴³ , Asn ⁴⁶ , Asp ⁴⁹ , His ⁵³ , Arg ¹²⁶ , Tyr ¹³⁰ , Gln ¹³⁴ , Leu ¹³⁵	Van der Waals
	Thr ¹³¹	Ligação de Hidrogênio
	Ser ¹²⁷	Ligação Carbono-Hidrogênio
	Glutathiona	π -Enxofre
	Tyr ²⁸ , Phe ⁴⁴	Empilhamento π - π em forma de T
	Ile ³² , Arg ³⁸ , Leu ³⁹ , Ala ¹³⁸	Alquil ou π -Alquil

LZG-085	Gly ³⁵ , Gln ³⁶ , Arg ³⁸ , Phe ⁴⁴ , Asp ⁴⁹ , Arg ⁵² , Arg ¹²⁶ , Ser ¹²⁷ , Tyr ¹³⁰ , Leu ¹³⁵	Van der Waals
	Thr ¹³¹ , Glutaciona	Ligação de Hidrogênio
	Glutaciona	π-Enxofre
	Tyr ²⁸ , Gln ¹³⁴	Empilhamento π-π ou Amida-π em forma de T
	Ile ³² , His ⁵³ , Ala ¹³⁸	π-Alquil

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

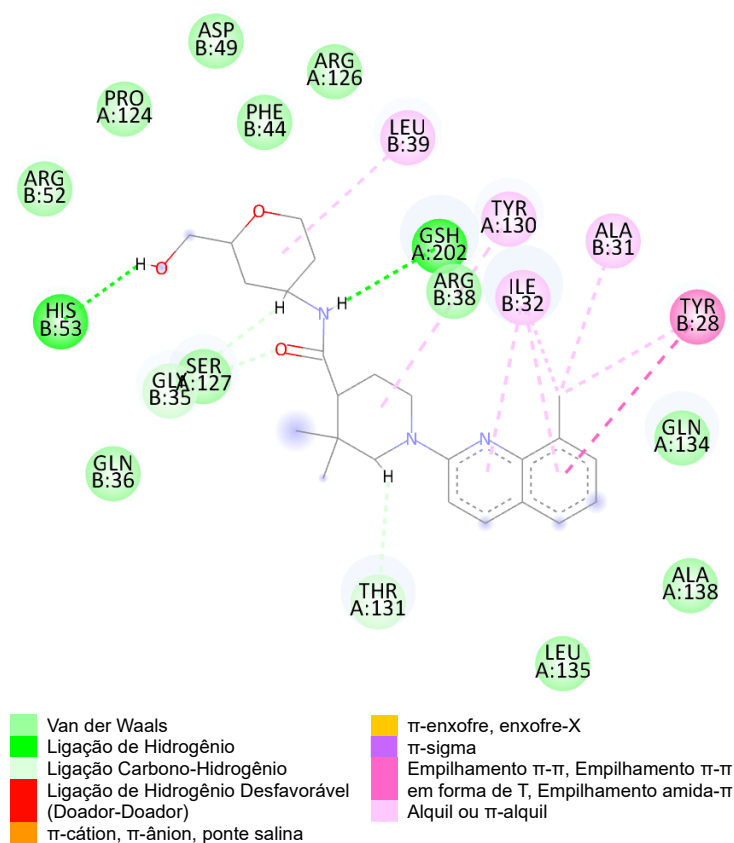
Figura 8 – Visualização tridimensional dos compostos ancorados no sítio ativo do alvo mPGES-1.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

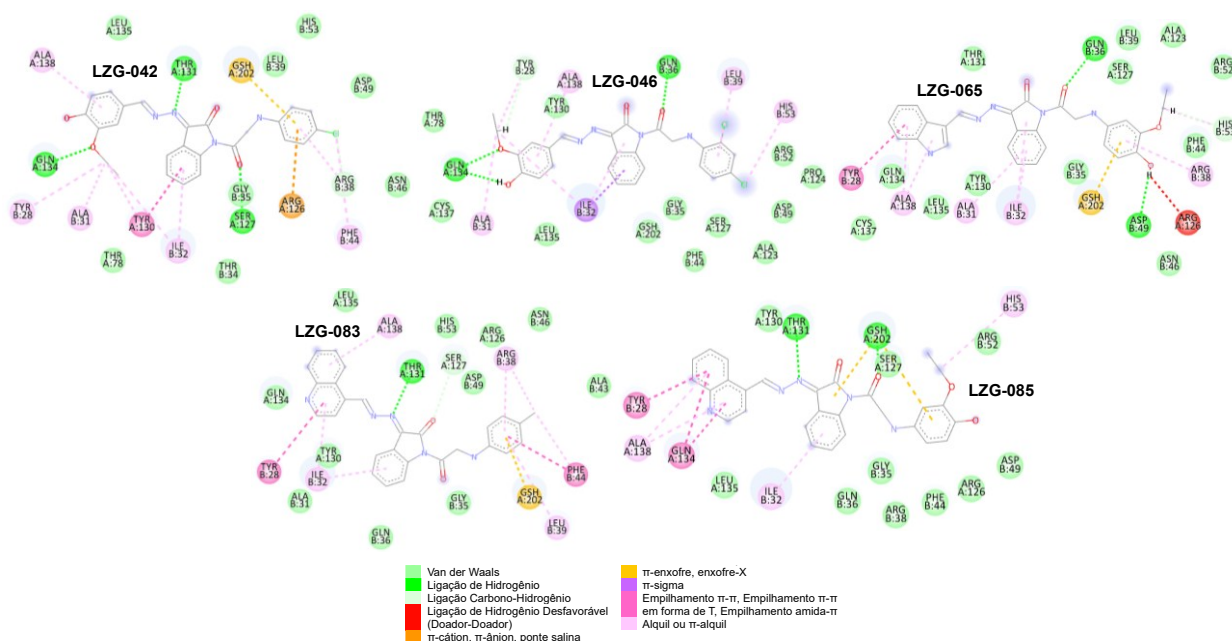
Notas: LZG-042 (amarelo), LZG-046 (roxo), LZG-065 (vermelho-marrom), LZG-083 (laranja), LZG-085 (ciano).

Figura 9 – Interações intermoleculares entre 6PW e mPGES-1.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Figura 10 – Interações intermoleculares entre os 5 melhores compostos e mPGES-1.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Considerando que inibidores de mPGES-1 ocupam o lugar do substrato no sítio ativo da enzima que está ativo em um dado momento, enquanto as outras duas cavidades permanecem inativas (HE et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2024; NASCIMENTO; AQUINO; SILVA JÚNIOR, 2022), compostos com maior afinidade a este alvo devem, de maneira similar, impedir a ação desta enzima sobre seu substrato ao ocupar os espaços dedicados à ligação e catálise do substrato em questão. Desta forma, ainda que tenham apresentado pior performance quanto ao *fitscore*, LZG-085 se mostra mais promissor quanto às suas interações previstas com o alvo, seguido por LZG-042.

5.2.1.2 Interações intermoleculares previstas com o alvo NLRP3 (PDB ID: 8RI2)

Já no receptor NLRP3, sua inibição farmacológica se dá através da estabilização de uma conformação inativa, que impede a ativação do receptor, quando moléculas ativas interagem com o resíduo Arg⁵⁷⁸. Além deste resíduo, interações com outros resíduos aparentam estabilizar os complexos deste alvo com inibidores – interações eletrostáticas com Ile⁴⁴¹, Phe⁵⁷⁵, Tyr⁶³² e Asp⁶⁶²; ligação de hidrogênio com Ala²²⁸; e interações hidrofóbicas com o alvo em geral (DEKKER et al., 2021; SANTOS NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR, 2022).

No NLRP3, todos os compostos interagem com Arg⁵⁷⁸ (Quadro 5, Figura 13). Portanto, interagem com o mínimo resíduo essencial para uma possível atividade biológica. Assim como visto anteriormente, os compostos interagem com todos os resíduos destacados na cor verde (Figura 11), mantendo relativa semelhança nas conformações enquanto próximos a estes resíduos. É possível, porém, observar que estes compostos têm variação nas poses entre si conforme se afastam desta região do sítio ativo próxima ao resíduo Arg⁵⁷⁸, algo que pode afetar a fixação destes compostos dependendo das interações que forem realizadas com resíduos longe desta zona.

De maneira geral, o único composto que realiza maior número de interações com NLRP3 em comparação com NP3-562 é LZG-065, realizando duas interações a mais com resíduos distintos (Quadro 5, Figura 13). Por outro lado, quanto ao número de interações eletrostáticas com os resíduos relevantes para esta categoria, apenas NP3-562 interage com Ile⁴⁴¹, Phe⁵⁷⁵, Tyr⁶³² e Asp⁶⁶². LZG-065 interage com Ile⁴⁴¹, Phe⁵⁷⁵ e Asp⁶⁶² (Quadro 5, Figura 13), enquanto LZG-083 interage com Phe⁵⁷⁵, Tyr⁶³²

e Asp⁶⁶² (Quadro 5, Figura 13), ambos possuindo uma interação a menos em quantidade. Em relação ao número de ligações de hidrogênio tanto com Arg⁵⁷⁸ quanto Ala²²⁸, LZG-065 se destaca sobre os outros compostos da mesma série por interagir com os dois e se igualar com NP3-562 (Quadro 5, Figura 13). Por fim, apenas LZG-065 se compara a NP3-562 em quantidade de interações hidrofóbicas, realizando nove interações com nove resíduos diferentes (Quadro 5, Figura 13).

Desta forma, em um primeiro momento, LZG-065 apresenta melhor potencial de inibição do alvo em comparação com NP3-562, tanto em questões de *score* quanto de interações com o alvo.

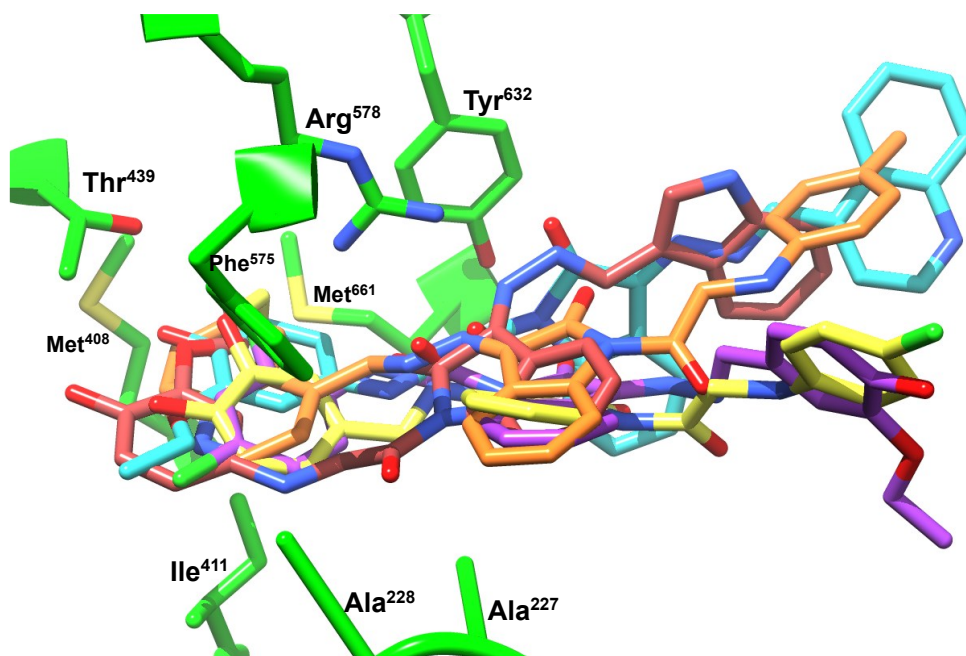
Quadro 5 – Interações intermoleculares entre compostos e resíduos de aminoácido no receptor NLRP3.

LIGANTE	RESÍDUOS	TIPO DE INTERAÇÃO
NP3-562	Gly ²²⁹ , Val ³⁵³ , Val ⁴¹⁴ , Thr ⁵²⁴ , Ile ⁵⁷⁴ , Phe ⁵⁷⁹ , Ser ⁶²⁶ , Glu ⁶³⁶ , Asp ⁶⁶² , Val ⁶⁶⁵	Van der Waals
	Glu ⁶²⁹	Ponte Salina
	Thr ⁴³⁹ , Arg ⁵⁷⁸	Ligação de Hidrogênio
	Gln ⁶²⁴ , Glu ⁶²⁹ , Tyr ⁶³²	Ligação Carbono-Hidrogênio
	Ala ²²⁸	Enxofre-X
	Arg ⁵⁷⁸	π -Cátion
	Phe ⁴¹⁰ , Phe ⁵⁷⁵	Empilhamento π - π em forma de T
	Ala ²²⁷ , Ala ²²⁸ , Met ⁴⁰⁸ , Ile ⁴¹¹ , Leu ⁴¹³ , Tyr ⁴⁴³ , Leu ⁶²⁸ , Tyr ⁶³² , Met ⁶⁶¹	Alquil ou π -Alquil
LZG-042	Ala ²²⁸ , Arg ³⁵¹ , Glu ³⁵⁶ , Met ⁴⁰⁸ , Phe ⁴¹⁰ , Val ⁴¹⁴ , Tyr ⁴⁴³ , Ile ⁵⁷⁴	Van der Waals
	Thr ⁴³⁹	Ligação de Hidrogênio
	Arg ⁵⁷⁸	π -Cátion
	Phe ⁵⁷⁵	Empilhamento π - π em forma de T
	Ala ²²⁷ , Pro ³⁵² , Val ³⁵³ , Ile ⁴¹¹ , Tyr ⁶³² , Met ⁶⁶¹	Alquil ou π -Alquil
LZG-046	Gln ²²⁵ , Arg ³⁵¹ , Glu ³⁵⁶ , Met ⁴⁰⁸ , Phe ⁴¹⁰ , Thr ⁴³⁹ , Thr ⁵²⁴ , Gln ⁶²⁴ , Tyr ⁶³² , Met ⁶⁶¹	Van der Waals
	Arg ⁵⁷⁸	Ligação de Hidrogênio
	Arg ⁵⁷⁸	π -Cátion
	Phe ⁵⁷⁵	Empilhamento π - π em forma de T
	Ala ²²⁷ , Ala ²²⁸ , Pro ³⁵² , Val ³⁵³ , Leu ³⁵⁵ , Ile ⁴¹¹ , Leu ⁴¹³	Alquil ou π -Alquil
LZG-065	Gly ²²⁹ , Arg ³⁵¹ , Met ⁴⁰⁸ , Phe ⁴¹⁰ , Leu ⁴¹³ , Ile ⁴¹⁷ , Tyr ⁴⁴³ , Thr ⁵²⁴ , Gln ⁶²⁴ , Tyr ⁶³² , Asn ⁶⁵⁶ , Ser ⁶⁵⁸ , Met ⁶⁶¹ , Asp ⁶⁶²	Van der Waals
	Ala ²²⁸ , Thr ⁴³⁹ , Arg ⁵⁷⁸ , Ser ⁶²⁶	Ligação de Hidrogênio
	Glu ⁶²⁹	Ligação Carbono-Hidrogênio
	Thr ⁴³⁹	Ligação de Hidrogênio Desfavorável (Doador-Doador)
	Phe ⁵⁷⁵	Empilhamento π - π em forma de T

	Ala ²²⁷ , Pro ³⁵² , Val ³⁵³ , Ile ⁴¹¹ , Val ⁴¹⁴ , Leu ⁶²⁸	Alquil ou π -Alquil
LZG-083	Leu ⁴¹³ , Val ⁴¹⁴ , Thr ⁴³⁹ , Thr ⁵²⁴ , Phe ⁵⁷⁵ , Gln ⁶²⁴ , Ser ⁶²⁶ , Gln ⁶²⁷ , Tyr ⁶³² , Ile ⁶⁵⁵ , Asn ⁶⁵⁶	Van der Waals
	Arg ⁵⁷⁸	Ligação de Hidrogênio
	Ala ²²⁸	Ligação Carbono-Hidrogênio
	Glu ⁶²⁹	π -Ânion
	Met ⁴⁰⁸	π -Enxofre
	Ala ²²⁷ , Arg ³⁵¹ , Pro ³⁵² , Val ³⁵³ , Ile ⁴¹¹ , Leu ⁶²⁸ , Met ⁶⁶¹	Alquil ou π -Alquil
LZG-085	Ala ²²⁷ , Ala ²²⁸ , Gly ²²⁹ , Met ⁴⁰⁸ , Phe ⁴¹⁰ , Leu ⁴¹³ , Val ⁴¹⁴ , Tyr ⁴⁴³ , Thr ⁵²⁴ , Ser ⁶²⁶ , Gln ⁶²⁷ , Glu ⁶²⁹ , Glu ⁶⁵⁴ , Ile ⁶⁵⁵ , Ser ⁶⁵⁸ , Thr ⁶⁵⁹	Van der Waals
	Thr ⁴³⁹ , Arg ⁵⁷⁸	Ligação de Hidrogênio
	Arg ⁵⁷⁸ , Asp ⁶⁶²	π -Cátion or π -Ânion
	Asn ⁶⁵⁶	π -Sigma
	Tyr ⁶³²	Empilhamento π - π
	Ile ⁴¹¹ , Phe ⁵⁷⁵ , Leu ⁶²⁸ , Met ⁶⁶¹	Alquil ou π -Alquil

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

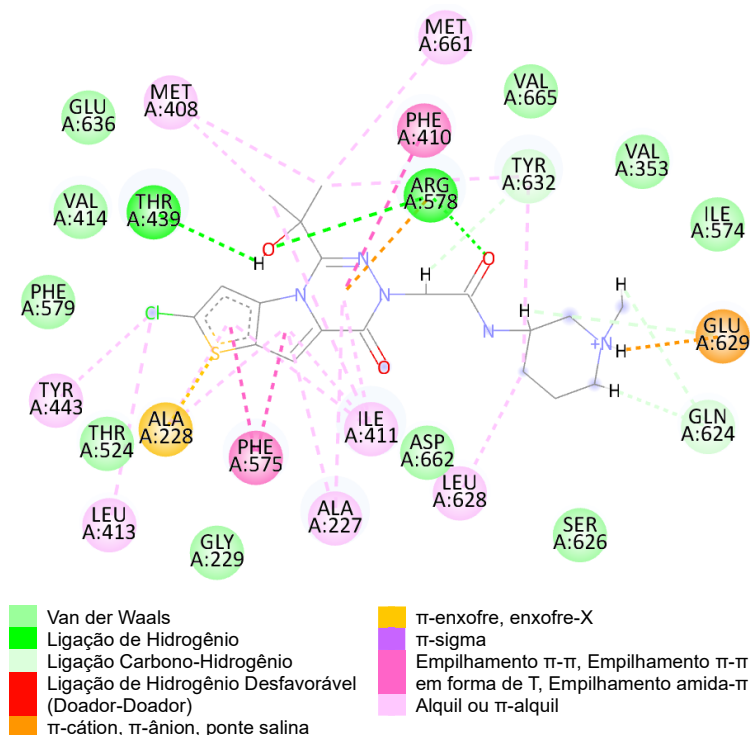
Figura 11 – Visualização tridimensional dos compostos ancorados no sítio ativo do alvo NLRP3.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

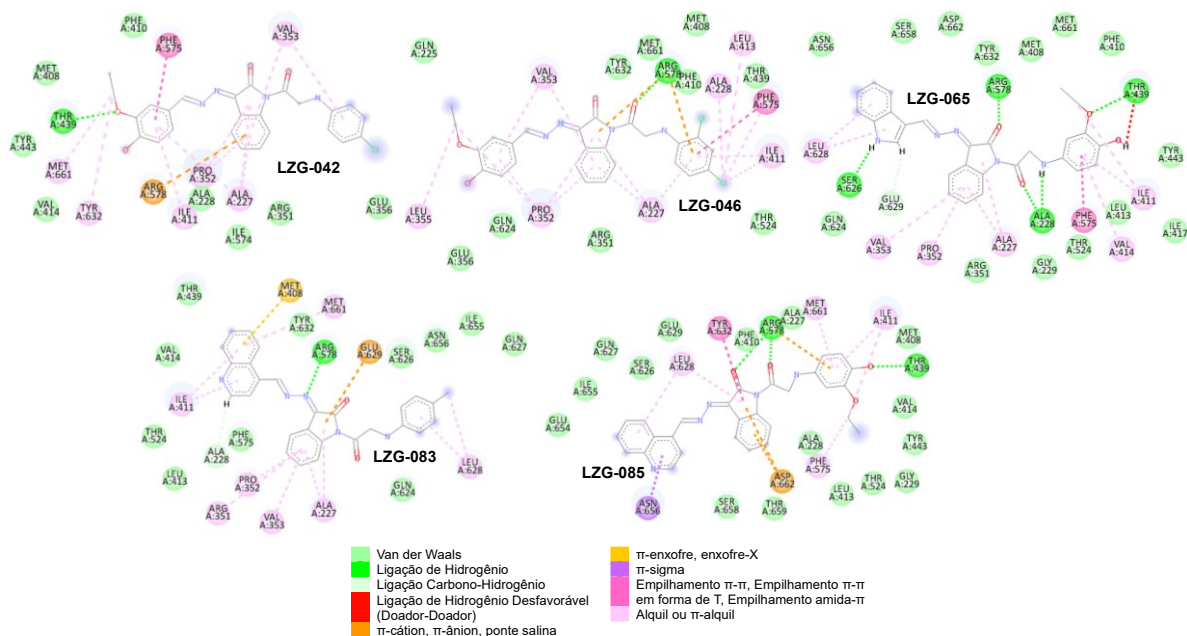
Notas: LZG-042 (amarelo), LZG-046 (roxo), LZG-065 (vermelho-marrom), LZG-083 (laranja), LZG-085 (ciano).

Figura 12 – Interações intermoleculares entre NP3-562 e NLRP3.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Figura 13 – Interações intermoleculares entre os 5 melhores compostos e NLRP3.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

É importante destacar que os algoritmos de ancoragem possuem limitações que podem gerar falsos-positivos ou falsos-negativos quando aplicados isoladamente. Uma das principais inclui a falta de flexibilidade das estruturas durante a avaliação

das interações entre ligantes ancorados e alvos macromoleculares. Por isso, ocasionalmente, compostos que não se ligam aos alvos da mesma maneira que os inibidores nativos à estrutura cristalográfica original podem sofrer de menor pontuação ao longo da triagem (ELOKELY; DOERKSEN, 2013; PANTSAR; POSO, 2018).

Portanto, devido às limitações da ancoragem, o estudo de modelagem molecular seguiu com os todos 5 melhores derivados dentre os 54, para melhor elucidação do potencial inibitório nos alvos estudados através da dinâmica molecular, mesmo que alguns possuíssem valor de fitscore inferior ao valor de referência. Desta forma, seriam evitados potenciais falso-positivos ou falso-negativos causado pela ancoragem sozinha.

5.3 Dinâmica molecular

5.3.1 Avaliação da estabilidade dos complexos estudados

5.3.1.1 Variação de desvio quadrático médio da raiz das posições atômicas (RMSD) ao longo da simulação

A qualidade das simulações de dinâmica molecular na enzima mPGES-1 foi bastante satisfatória, com performance superior a resultados encontrados na literatura (CHANG et al., 2011; ERENSOY et al., 2023; GUPTA; CHAUDHARY; APAROY, 2018; NASCIMENTO et al., 2024; ZHOU et al., 2019). Tanto a apoproteína como seus complexos com inibidores não superam em todo o gráfico o valor de 2 Å, mantendo-se em torno de 1,5 Å e, demonstrando a qualidade e fidelidade do modelo trimérico na previsão do comportamento de inibidores da mPGES-1.

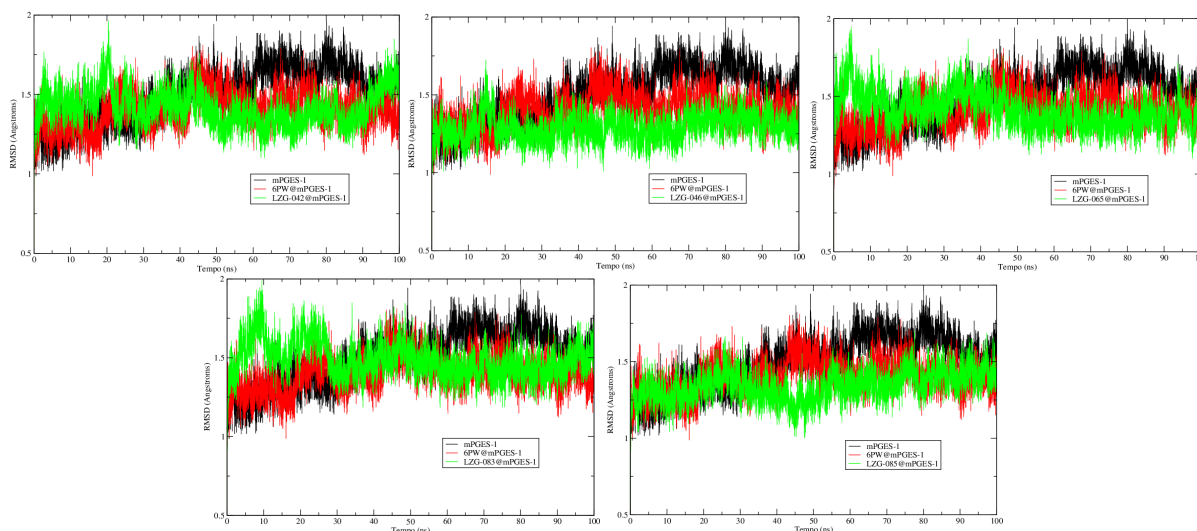
Quanto ao receptor NLRP3, a performance das simulações foi também satisfatória. A estabilidade de seus complexos com inibidores foi superior à estabilidade da apoproteína, alcançando estabilidade semelhante ou superior à de outros estudos (CAO et al., 2022; LAI; DO; NGUYEN, 2022; MENEZES et al., 2024; PATIL et al., 2022). É importante destacar que o modelo construído para avaliação da inibição deste alvo neste trabalho, assim como na literatura citada, envolve apenas o domínio NACHT contendo o sítio de ligação a ATP (DEKKER et al., 2021; VELCICKY et al., 2024) devido às limitações computacionais que não tornam prático simular a estrutura inteira, por ser uma proteína de grandes dimensões.

Analisando a performance dos ligantes na estabilização dos compostos no alvo mPGES-1, LZG-046 e LZG-085 foram mais bem-sucedidos em comparação com os

outros derivados (Figura 14), com LZG-046 alcançando estabilidade do complexo em torno de 1,25 Å após 25 ns (Figura 14). A trajetória de LZG-085 foi menos estável, demonstrando uma queda brusca de RMSD do complexo aos 45 ns, estabilizando entre 1,25 e 1,5 Å aos 55 ns durante 20 ns e, finalmente, elevando gradualmente o RMSD para cerca de 1,5 Å a partir dos 75 ns até o fim da simulação, valor visivelmente superior aos últimos valores de RMSD do complexo-referência (Figura 14).

Portanto, neste modelo molecular da enzima mPGES-1, os compostos LZG-046 e LZG-085 apresentaram melhor inibição do alvo, ao manter seus complexos com este mais estáveis em comparação com o inibidor conhecido 6PW.

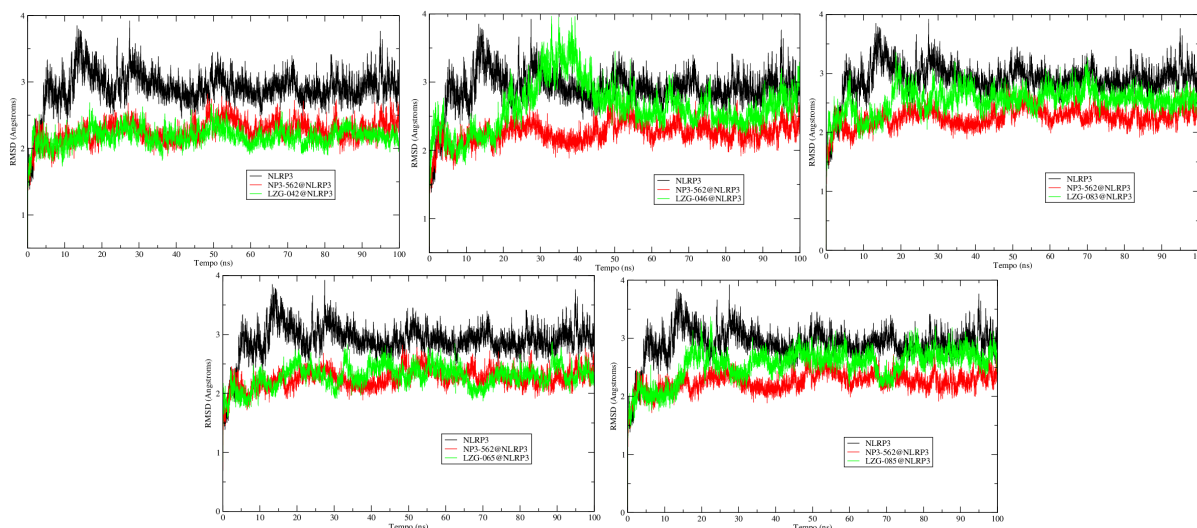
Figura 14 – Gráficos de variação do RMSD ao longo do tempo para os complexos de mPGES-1 com os 5 melhores compostos da ancoragem.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Por outro lado, é possível notar que apenas LZG-042 teve sucesso no alvo NLRP3, em vista de sua trajetória ao longo da simulação equiparável em estabilidade ao complexo com o inibidor co-cristalizado, além de possuir estabilidade superior aos outros quatro derivados testados (Figura 15). Desta forma, este composto tem maior probabilidade de apresentar atividade biológica contra o alvo em comparação com seus congêneres.

Figura 15 – Gráficos de variação do RMSD ao longo do tempo para os complexos de NLRP3 com os 5 melhores compostos da ancoragem.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Devido à alta instabilidade observada, os estudos não prosseguiram para LZG-046, LZG-065, LZG-083 e LZG-085 nos complexos com NLRP3, nem para LZG-042, LZG-065 e LZG-083, em complexo com mPGES-1. Portanto, nas análises subsequentes referentes às simulações de dinâmica molecular, serão considerados apenas os complexos de LZG-042 com NLRP3 bem como os de LZG-046 e LZG-085 com mPGES-1.

5.3.1.2 Flutuação de desvio quadrático médio (RMSF) para resíduos de aminoácido dos alvos

A estabilização dos complexos é estudada com maior detalhe através da análise do RMSF, onde deve ser demonstrada uma menor flutuação de resíduos importantes no sítio ativo. Desconsiderando-se os resíduos terminais, foram detectados picos de flutuação entre os resíduos 50 a 60, 90 a 100 e 110 a 130 em todas as cadeias da mPGES-1 (Figura 16). Estas regiões correspondem a trechos da sequência multimérica que formam regiões de alça. No terceiro pico da cadeia A, encontram-se os resíduos do sítio ativo Tyr¹³⁰ e Ser¹²⁷, enquanto no primeiro pico da cadeia B, encontra-se His⁵³. Portanto, é possível assumir que, ao estabilizar as regiões de alça onde residem estes resíduos, haverá uma melhor inibição do alvo (KUKLISH et al., 2016).

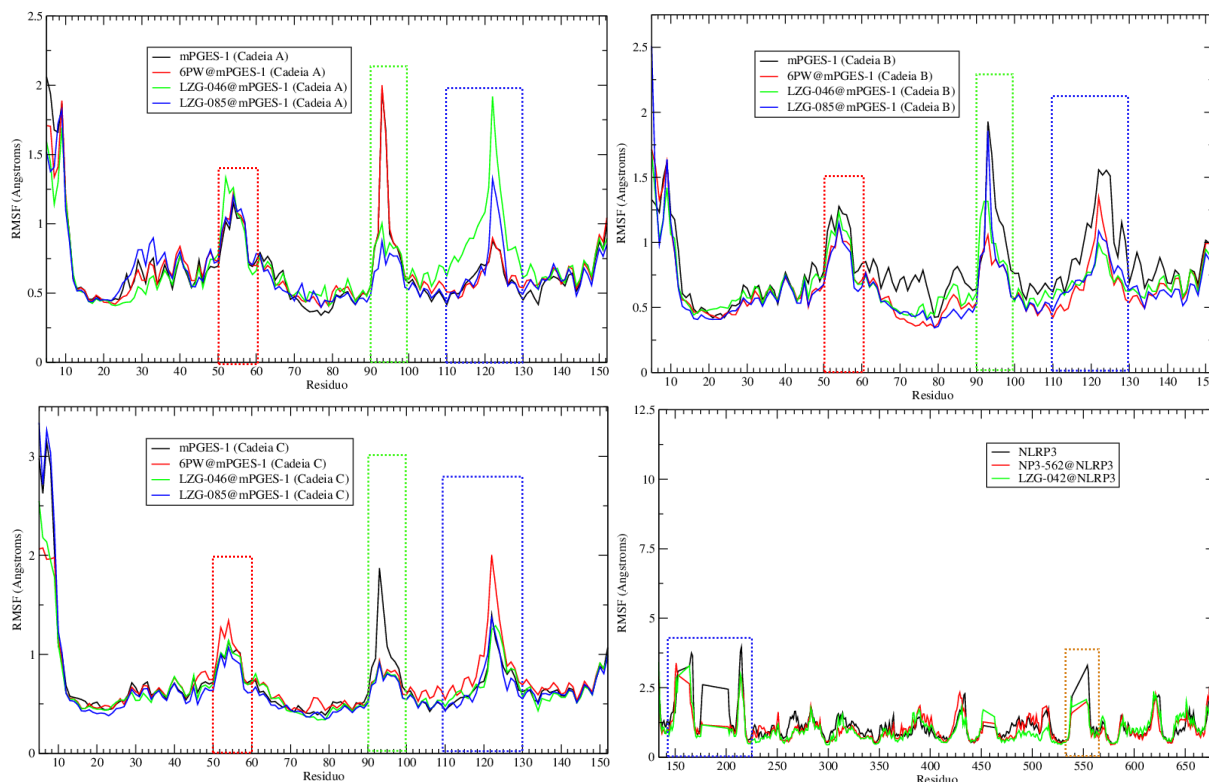
Nestes complexos, pode ser observada a maior instabilidade dos resíduos na cadeia C em comparação com as cadeias A e B (Figura 16) da mPGES-1. Os sítios ativos entre as cadeias C e A, bem como entre as cadeias B e C, não são estabilizados

por inibidores. Entretanto, isto é coerente com o funcionamento da enzima e o planejamento da simulação, considerando que os ligantes estão presentes apenas entre as cadeias A e B. Afinal, apesar de existirem três deles, apenas um dos sítios ativos pode estar acessível em um dado momento (HE et al., 2011). As tendências de flutuação para os trechos de aminoácidos supracitados conferem com experimentos publicados na literatura, com destaque para as regiões de alça ao redor do resíduo 55 e do resíduo 120 (ERENSOY et al., 2023; GUPTA; CHAUDHARY; APAROY, 2018; NASCIMENTO et al., 2024), sugerindo que os complexos com inibidores adotam comportamentos similares aos encontrados neste trabalho.

Observando o comportamento dos complexos na cadeia A (Figura 16), percebe-se que LZG-046 tem dificuldade de estabilizar os resíduos da alça no terceiro pico, quando comparado com LZG-085. Ambos falham em estabilizar esta região quando comparados ao inibidor conhecido. Quanto à alça da cadeia B (Figura 16) no terceiro pico, LZG-046 não estabiliza os resíduos tão bem como LZG-085, além de que ambos também possuem maior dificuldade de estabilização em relação ao inibidor conhecido.

Em outra nota, as aparentes regiões de maior instabilidade em NLRP3 não envolvem a região do sítio ativo, com exceção de Phe⁵⁷⁵, sendo estas os trechos entre os resíduos 150 a 225 e 525 a 575 (Figura 16). Estas se devem ao fato de alguns trechos na estrutura cristalográfica não possuírem resíduos que deveriam estar presentes, como dita a sequência de aminoácidos original deste alvo. Visto que esta estrutura abrange apenas o domínio NACHT de NLRP3, isto é consistente com o método da modelagem (VELCICKY et al., 2024). A performance de todos os compostos em complexo com NLRP3, bem como a proteína sem estar ligada a inibidores, não apresenta grandes distinções. Assim, pode ser visto que a presença dos ligantes pouco afeta a estabilidade dos resíduos em seus complexos. Por fim, as faixas de flutuação dos resíduos apresentados no gráfico foram tão ou mais estáveis quanto as de experimentos similares publicados sobre este alvo (CAO et al., 2022; LAI; DO; NGUYEN, 2022; MENEZES et al., 2024; PATIL et al., 2022).

Figura 16 – Flutuação de RMS por resíduo nos complexos LZG-046/mPGES-1, LZG-085/mPGES-1 e LZG-042/NLRP3.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

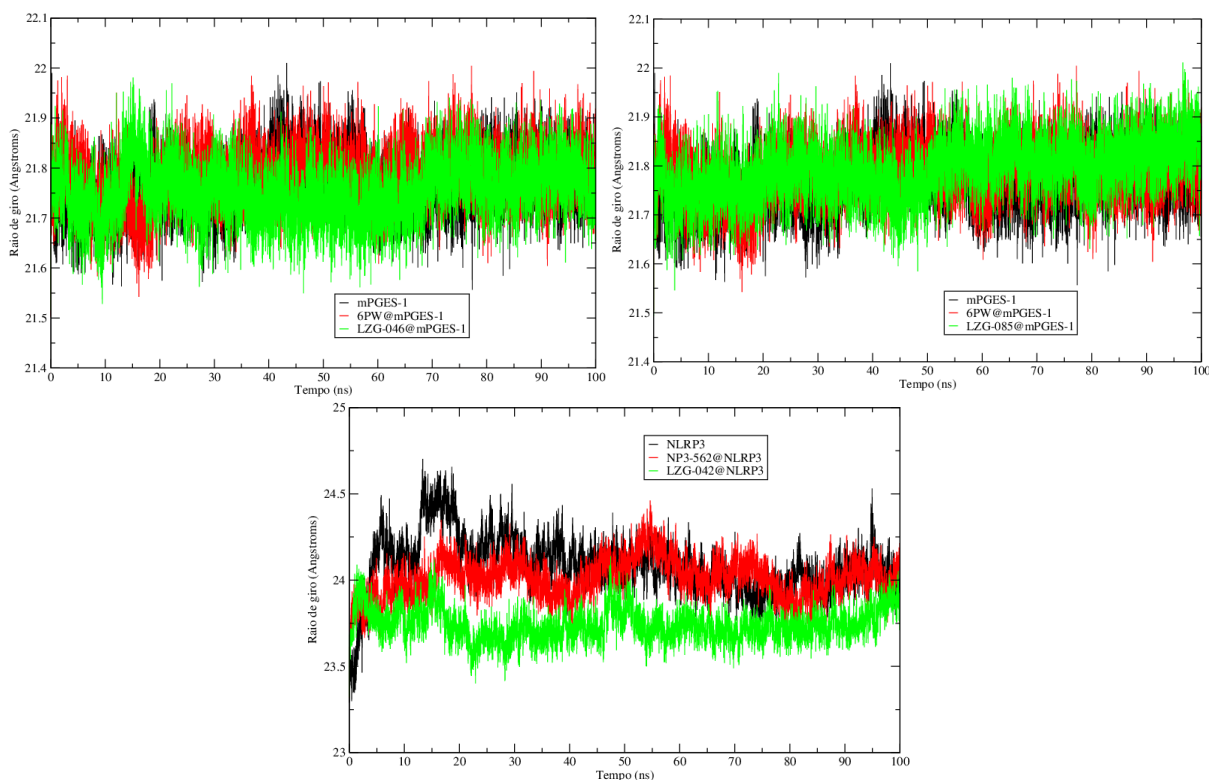
5.3.1.3 Variação de raio de giro (Rg) ao longo da simulação

O estudo do Rg, no geral, demonstra baixa variação da performance entre os complexos quanto às suas tendências (Figura 17). Há uma maior compactação da proteína causada por LZG-042 em NLRP3 (Figura 17) quando comparado a NP3-562. A compactação da proteína NLRP3, avaliada pelo raio de giro, assumiu diferentes comportamentos quando complexada com diferentes ligantes na literatura.

Menezes e colaboradores (2024) encontraram um raio de giro em torno de 23,75 Å para o complexo com o composto GDC-2394, mas com variação instável, chegando a alcançar pouco mais de 24 Å. Kaempferol e isovitexina alcançaram valores próximos de 27 Å (NALBAN et al., 2024), enquanto a licopiranocumarina manteve valores estáveis pouco acima de 23,5 Å (CAO et al., 2022). Por fim, MCC-950 e BID-3 estabilizaram seus valores de raio de giro em torno de 22,5 Å (PATIL et al., 2022). Portanto, é visível que o comportamento da apo-NLRP3 e de seus complexos com NP3-562 e LZG-042 (Figura 17) encontra-se dentro do esperado para inibidores similarmente estudados, por demonstrarem tendências e valores relativos à compactação da proteína correspondentes aos dos estudos descritos.

Para mPGES-1, as tendências encontradas para o raio de giro na literatura apresentaram padrões diversos. Houve complexos com valores entre 21,5 e 22 Å (GUPTA; CHAUDHARY; APAROY, 2018), entre 19 e 20 Å (NASCIMENTO et al., 2024), bem como houve outros complexos mais compactados com valores entre 13,2 e 14,4 Å (ERENSOY et al., 2023). É possível afirmar que os complexos neste trabalho não se desviaram da performance de compostos estudados na literatura, com LZG-046 mantendo-se em torno de 21,75 Å, enquanto LZG-085 permanece entre 21,6 e 21,9 Å (Figura 17). Assim, pode ser inferido bom potencial para estabilização dos alvos e subsequente atividade inibitória.

Figura 17 – Variação do raio de giro ao longo do tempo nos complexos LZG-046/mPGES-1, LZG-085/mPGES-1 e LZG-042/NLRP3.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

5.3.1.4 Número de ligações de hidrogênio entre ligante e alvo ao longo da simulação

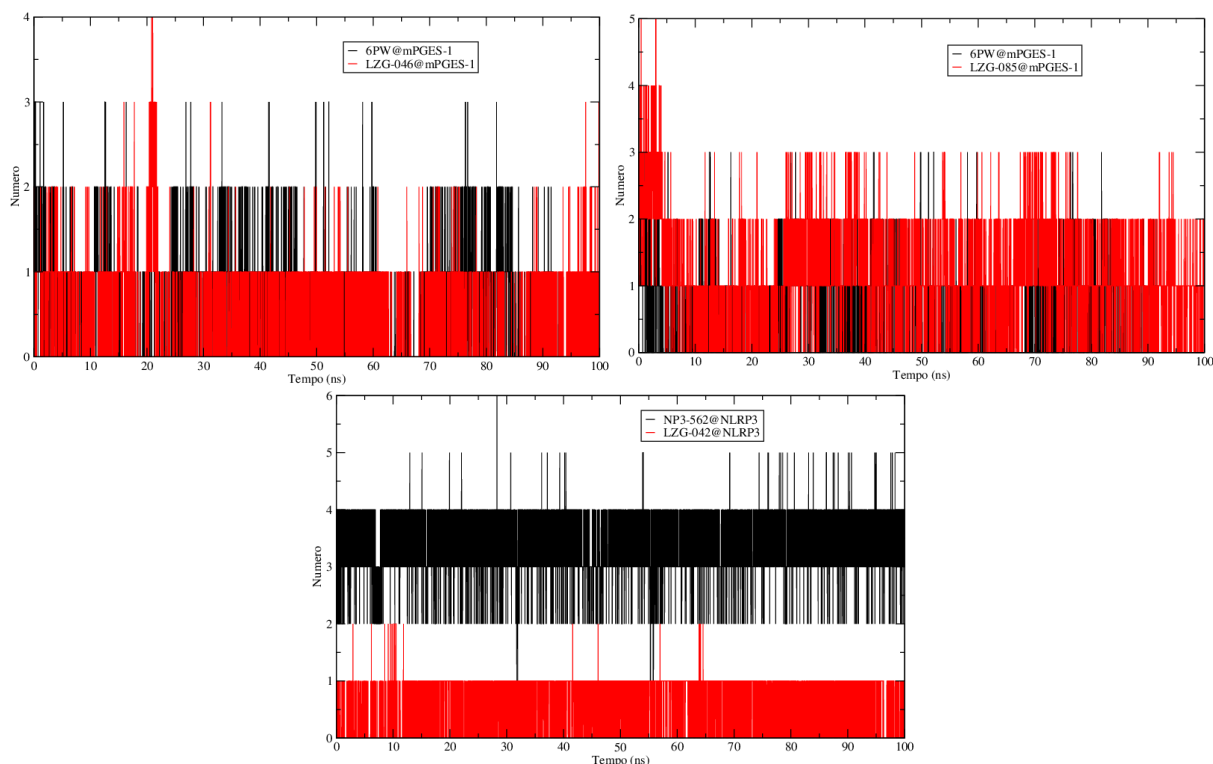
Quanto às ligações de hidrogênio formadas entre ligantes e proteínas, que demonstram a capacidade deste ligante interagir com o alvo e estabilizar seu complexo com este (MENEZES et al., 2024; NASCIMENTO et al., 2024), LZG-085

mantém mais interações com mPGES-1 do que LZG-046, chegando a um máximo de cinco ligações simultâneas no começo da simulação, comparado a um máximo de quatro ligações aos 20 ns (Figura 18). Este resultado para LZG-085 diverge dos resultados anteriores, visto que até então este não estabilizou seu complexo tão bem quanto LZG-046.

Infelizmente, é visível a dificuldade da manutenção de ligações de hidrogênio entre LZG-042 e NLRP3, em comparação com NP3-562, considerando que os gráficos demonstram a manutenção de apenas uma ligação durante a maior parte da simulação por LZG-042 (Figura 18), que pode indicar um menor tempo de interação deste composto com seu alvo.

Comparada a resultados encontrados na literatura, a performance de LZG-042 em NLRP3 foi inferior à de diversos compostos. A licopiranocumarina manteve em torno de 2 a 3 ligações com NLRP3 durante a maior parte da simulação, chegando a formar um máximo de 6 (CAO et al., 2022), assim como BID-3 (PATIL et al., 2022). GDC- 2394 formou entre 4 a 5 ligações ao longo da simulação, alcançando até 8 ligações em um dado momento (MENEZES et al., 2024). Para inibidores de mPGES-1 avaliados em simulações publicadas na literatura formaram entre 1 a 3 ou entre 2 a 6 ligações de hidrogênio ao longo da simulação, portanto, ambos os compostos estão de acordo com as evidências encontradas (CHANG et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2024).

Figura 18 – Ligações de hidrogênio ligante-alvo formadas ao longo do tempo nos complexos LZG-046/mPGES-1, LZG-085/mPGES-1 e LZG-042/NLRP3.



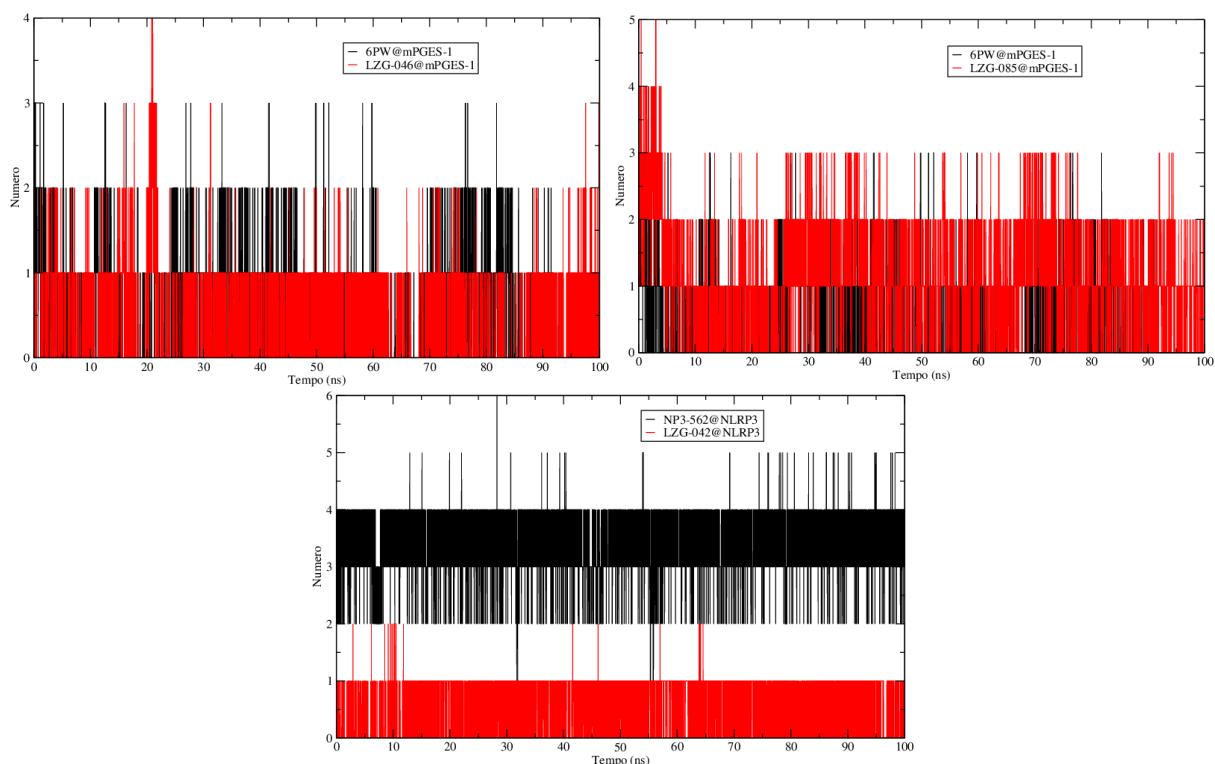
Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

5.3.1.5 Variação de área acessível a solvente (SASA) ao longo da simulação

Ademais, os valores de SASA ao longo da simulação, que simbolizam a capacidade do solvente aquoso penetrar nas cavidades de uma macromolécula (MENEZES et al., 2024; NASCIMENTO et al., 2024), não apresentam grandes variações entre si para os complexos estudados (Figura 19). LZG-046 se destaca ao ser mais bem sucedido em diminuir a invasão da água na mPGES-1 (Figura 19).

O comportamento da variação da área acessível a solvente em NLRP3 e seus complexos é compatível com resultados encontrados na literatura (CAO et al., 2022; MENEZES et al., 2024; PATIL et al., 2022). Já para mPGES-1, os valores absolutos de SASA são maiores que os encontrados na literatura, devido ao modelo trimérico aplicado neste trabalho, ao invés do uso do monômero isolado. Porém, o comportamento observado ao longo da trajetória é proporcional a estes valores (NASCIMENTO et al., 2024). Desta forma, no geral, os compostos estudados possuem propriedades similares a inibidores estudados em trabalhos de metodologia similar.

Figura 19 – Variação da área de superfície acessível a solvente ao longo do tempo nos complexos LZG-046/mPGES-1, LZG-085/mPGES-1 e LZG-042/NLRP3.



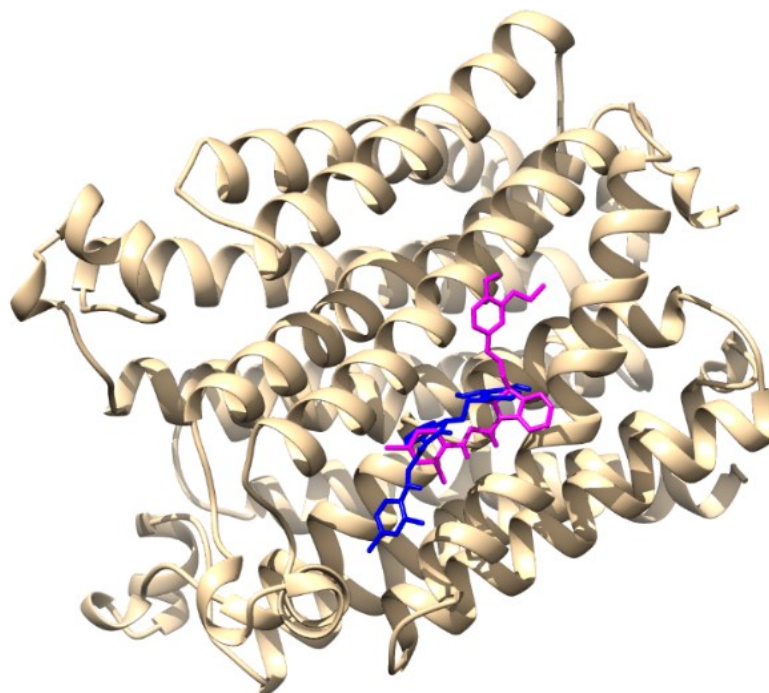
Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

5.3.1.6 Posições inicial e final dos ligantes estudados

Durante a trajetória, LZG-042 e LZG-085 tiveram sucesso em se manter próximos às posições iniciais obtidas durante a ancoragem para seus respectivos alvos (Figuras 21-22).

Por outro lado, LZG-046 migrou para um espaço próximo à cavidade inicial na mPGES-1 (Figura 20), afastando-se dos resíduos presentes no sítio ativo. Ao que os resultados anteriores indicam, isto não afetou sua capacidade de estabilizar a proteína, mas levanta preocupações sobre sua capacidade de impedir a catálise do substrato desta enzima. Afinal, mesmo que o complexo seja estabilizado, se a prostaglandina H2 ainda possuir a capacidade de se ligar ao sítio ativo na ausência do inibidor, possivelmente este alvo não será inibido de maneira eficiente. Portanto, LZG-046 não prosseguiu para estudos posteriores, por ser prevista sua incapacidade de inibição tanto da mPGES-1 quanto do NLRP3.

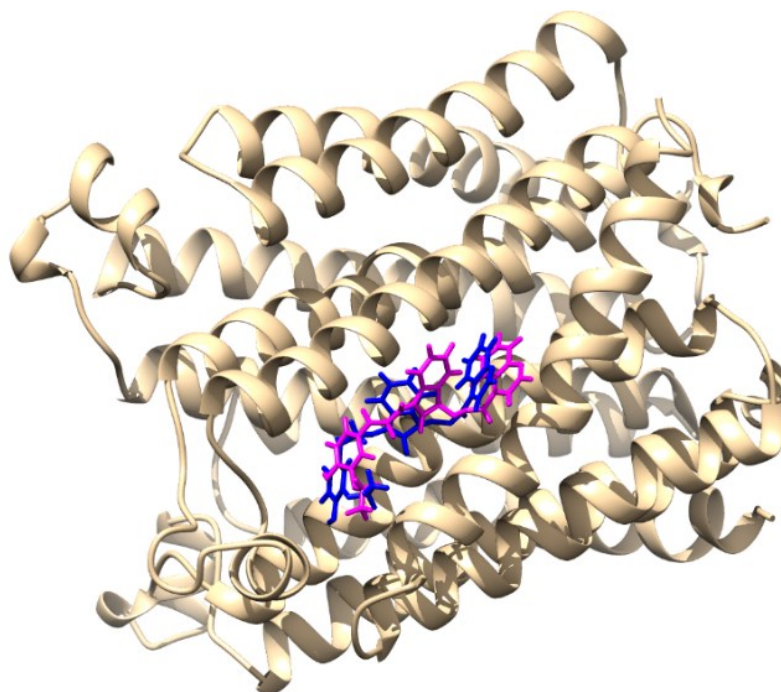
Figura 20 – Posições inicial e final do composto LZG-046 em complexo com mPGES-1 após a simulação.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Notas: Posição inicial em azul, posição final em magenta.

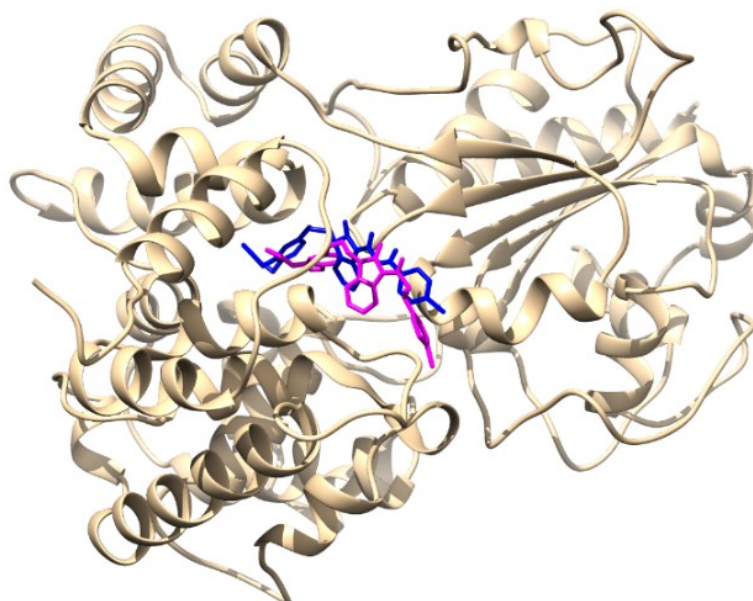
Figura 21 – Posições inicial e final do composto LZG-085 em complexo com mPGES-1 após a simulação.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Notas: Posição inicial em azul, posição final em magenta.

Figura 22 – Posições inicial e final do composto LZG-042 em complexo com NLRP3 após a simulação.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Notas: Posição inicial em azul, posição final em magenta.

5.3.2 Análise da energia livre de ligação e seus componentes energéticos obtidos por MM-PBSA

Para triagem subsequente, visando contornar as limitações da ancoragem supracitadas, foram estudados os valores de energia livre de ligação estimados para os compostos remanescentes na triagem – LZG-043 em NLRP3 e LZG-085 em mPGES-1. Na mPGES-1, LZG-085 apresentou energia livre de ligação menor quando comparado ao inibidor de referência (Quadro 6), possibilitando estudos subsequentes. A contribuição polar referente à energia livre de solvatação para LZG-085 apresenta um valor duas vezes maior que o inibidor de referência, sugerindo que este composto torna mais difícil a invasão de solvente polar no sítio ativo, fator evidenciado pela literatura. Além disso, os menores valores de contribuição eletrostática e menor energia de Van der Waals são fatores adicionalmente favoráveis à estabilidade dos complexos (GUPTA; CHAUDHARY; APAROY, 2018; NASCIMENTO et al., 2024).

Por outro lado, os cálculos de energia livre de ligação demonstram a inaptidão do LZG-042 em ligar-se suficientemente ao NLRP3 em comparação com o inibidor co-cristalizado (Quadro 7). A energia de ligação muito inferior ao inibidor conhecido pode

estar relacionada à maior rigidez estrutural do composto originalmente complexado na estrutura cristalográfica original, comparado a LZG-042, que possui menor rigidez devido ao seu maior número de ligações rotacionáveis. Isto explicaria a pior performance de LZG-042, mesmo que os componentes energéticos teoricamente atenderiam aos critérios para estabilizar o complexo e potencialmente inibir o alvo durante ensaios biológicos – energia de Van der Waals menor, energia eletrostática menor, valores positivos de contribuição polar à solvatação e valores negativos de contribuição não-polar (MENEZES et al., 2024). Portanto, a prevista incapacidade do composto de se ligar tão bem quanto um inibidor conhecido inviabiliza estudos posteriores deste composto no NLRP3, o último alvo onde este ainda poderia ter sido considerado ativo em um organismo, hipoteticamente.

Quadro 6 – Cálculos de energia livre de ligação e seus componentes energéticos para os compostos ligados a mPGES-1.

Componentes Energéticos (kcal/mol)	6PW	LZG-085
ΔE_{VDW}	-25.24 ± 1.65	-35.64 ± 1.79
ΔE_{ELE}	-2.55 ± 2.42	-14.36 ± 3.58
ΔG_{POLAR}	20.49 ± 2.63	41.01 ± 2.3
$\Delta G_{N\tilde{A}O-POLAR}$	-3.9 ± 0.09	-4.99 ± 0.03
$\Delta G_{LIGA\tilde{C}AO}$	-11.19 ± 3.94	-13.98 ± 4.66

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Quadro 7 – Cálculos de energia livre de ligação e seus componentes energéticos para os compostos ligados a NLRP3.

Componentes Energéticos (kcal/mol)	A1H02	LZG-042
ΔE_{VDW}	-41.26 ± 0.92	-43.25 ± 1.29
ΔE_{ELE}	-78.33 ± 2.49	-8.22 ± 2.1
ΔG_{POLAR}	83.97 ± 0.66	39.94 ± 0.71
$\Delta G_{N\tilde{A}O-POLAR}$	-4.74 ± 0.01	-5.43 ± 0.06
$\Delta G_{LIGA\tilde{C}AO}$	-40.36 ± 2.81	-16.96 ± 2.63

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

5.4 Análise dos cálculos de DFT

Como o LUMO é responsável por captar elétrons durante a formação de uma ligação covalente entre moléculas ao interagir com o HOMO de outro composto, determinar onde está localizada a densidade eletrônica do LUMO pode fornecer informações sobre as regiões mais quimicamente reativas de um material (RADHI, 2020). A diferença entre as energias dos orbitais moleculares de fronteira (HOMO-LUMO) se apresentou menor para LZG-085 em comparação com 6PW. Desta forma,

a energia necessária para que LZG-085 aceite elétrons de outras moléculas, além de ser menor que a energia para 6PW sofrer o mesmo fenômeno, assume valor negativo (KAUSAR; NAYEEM, 2018). Assim, considera-se que LZG-085 seria ionizado mais facilmente, indicando uma maior reatividade deste composto e alertando para uma maior susceptibilidade a reações (Quadro 8).

Ademais, na análise das regiões de densidade eletrônica para estes orbitais moleculares de fronteira (Figura 23), foi identificado que tanto o núcleo isatínico-hidrazônico como o grupo quinolínico poderiam estar envolvidos em reações de biotransformação, considerando que a densidade eletrônica do LUMO (Figura 23) está sobreposta nestes grupos. Desta forma, a região de densidade eletrônica deste orbital está mais suscetível a ataques por nucleófilos no organismo durante seu percurso até os tecidos-alvo (MAHAL et al., 2024; MATUSZEK; REYNISSON, 2016).

Adicionalmente, o potencial de ionização (IP) prevê a quantidade de energia necessária para remover elétrons de determinadas moléculas ou átomos, onde compostos com valores mais altos de IP são mais estáveis. Similarmente, a afinidade eletrônica (EA) mede a quantidade de energia liberada quando um elétron é absorvido por um determinado sistema. Em reações com nucleófilos, moléculas mais reativas possuem menor energia de LUMO e, portanto, maior valor de EA. Por fim, o momento de dipolo (D) avalia a polaridade ou carga absoluta de uma molécula, informando sobre a capacidade de permear membranas lipofílicas para um determinado composto (MAHAL et al., 2024; MATUSZEK; REYNISSON, 2016).

Desta forma, evidências recentes preveem os seguintes valores para boa farmacocinética: D menor ou igual a 10 Debye; IP entre 6.0 e 9.0 eV; EA entre 1.5 e 2.0 eV (KAUSAR; NAYEEM, 2018; MATUSZEK; REYNISSON, 2016). É possível observar que LZG-085 extrapola o valor ideal para EA e IP, corroborando novamente sua maior susceptibilidade às reações de biotransformação. Entretanto, seu valor de D favorece a capacidade deste composto em ser absorvido e distribuído através de membranas (Quadro 8).

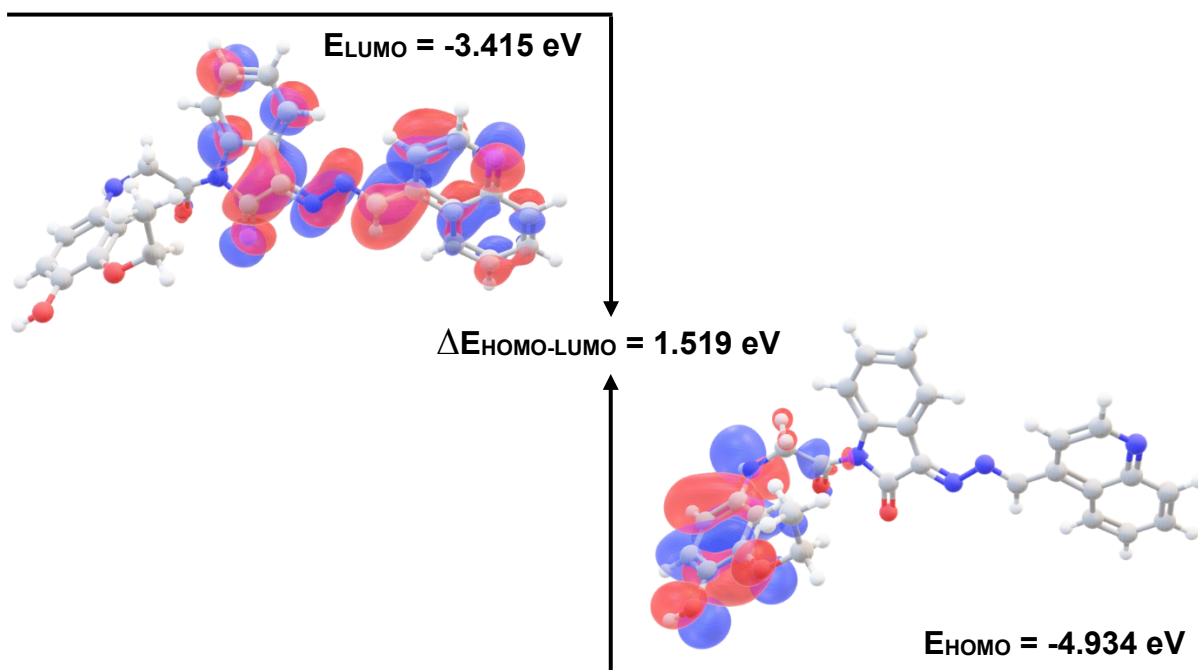
Quadro 8 – Propriedades físico-químicas calculadas por Teoria do Funcional de Densidade.

	6PW	LZG-085
Energia do HOMO (eV)	-5.337	-4.934
Energia do LUMO (eV)	-1.151	-3.415
Diferença HOMO-LUMO (eV)	4.186	1.519

Potencial de Ionização (eV)	5.337	4.934
Afinidade Eletrônica (eV)	1.151	3.415
Potencial Eletroquímico (eV)	3.244	4.175
Energia Molecular (kcal/mol)	-1323.509	-1654.378
Momento de Dipolo (Debye)	5.222	5.806

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 23 – Áreas de densidade eletrônica estimada para os orbitais moleculares de fronteira do composto LZG-085.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

5.5 Análise do perfil farmacocinético *in silico* previsto

Desta forma, apenas LZG-085 prosseguiu para a análise farmacocinética por ter sido o único a apresentar performance farmacodinâmica prevista adequada a partir das técnicas de modelagem anteriores. LZG-085 teve sucesso em todos os critérios de drogabilidade de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997) (Quadro 9). Uma solubilidade aquosa moderada foi prevista para LZG-085 a partir do modelo ESOL, ao passo que este possui também alta absorção no trato gastrointestinal (TGI) prevista (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Entretanto, este composto não tem atividade prevista no sistema nervoso central, por possivelmente não atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) por difusão passiva, sendo este o mecanismo principal de ingresso de pequenas moléculas neste compartimento do organismo (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; DI et al., 2012). O gráfico BOILED-EGG (Figura 24)

demonstra estas propriedades ao posicionar o composto na região da “clara” do ovo – nesta, os compostos podem ser bem absorvidos no TGI, mas não atravessam a BHE (DAINA; ZOETE, 2016).

Outra propriedade ilustrada pelo gráfico será se o composto pode ser um substrato de glicoproteína-P (PGP), transportador crucial tanto para o deslocamento de fármacos do lúmen intestinal para as células epiteliais quanto para a expulsão de fármacos que permeiam da circulação sistêmica para o SNC (LIN; YAMAZAKI, 2003). Neste caso, LZG-085 não foi previsto para sofrer a ação de bomba de efluxo da PGP (Quadro 9, Figura X). Portanto, possivelmente não sofrerá efeitos deletérios quanto à sua absorção intestinal, assim como não causará interações com fármacos cuja farmacocinética envolve a ação deste transportador (HUANG et al., 2008).

Além disso, de acordo com as previsões do modelo farmacocinético, LZG-085 pode eventualmente inibir as isoenzimas CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4 do citocromo P450 (Quadro 9). Esta previsão corrobora potenciais interações medicamentosas com fármacos cuja depuração depende das reações de biotransformação catalisadas por estas isoenzimas, já que estas enzimas afetam uma porção considerável dos fármacos disponíveis no mercado (HOLLENBERG, 2002; HUANG et al., 2008).

A inibição enzimática por LZG-085 implica em aumento da concentração plasmática dos seguintes fármacos, por exemplo: omeprazol, substrato de CYP2C19; tolbutamida, substrato de CYP2C9; ou midazolam, substrato de CYP3A4 (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2023). Apesar destas interações não serem problemáticas para pacientes que apenas usariam este potencial fármaco de maneira isolada, estas características podem limitar a aplicação terapêutica de LZG-085 para pacientes em uso de polifarmácia, particularmente para populações vulneráveis como os idosos (SECOLI, 2010).

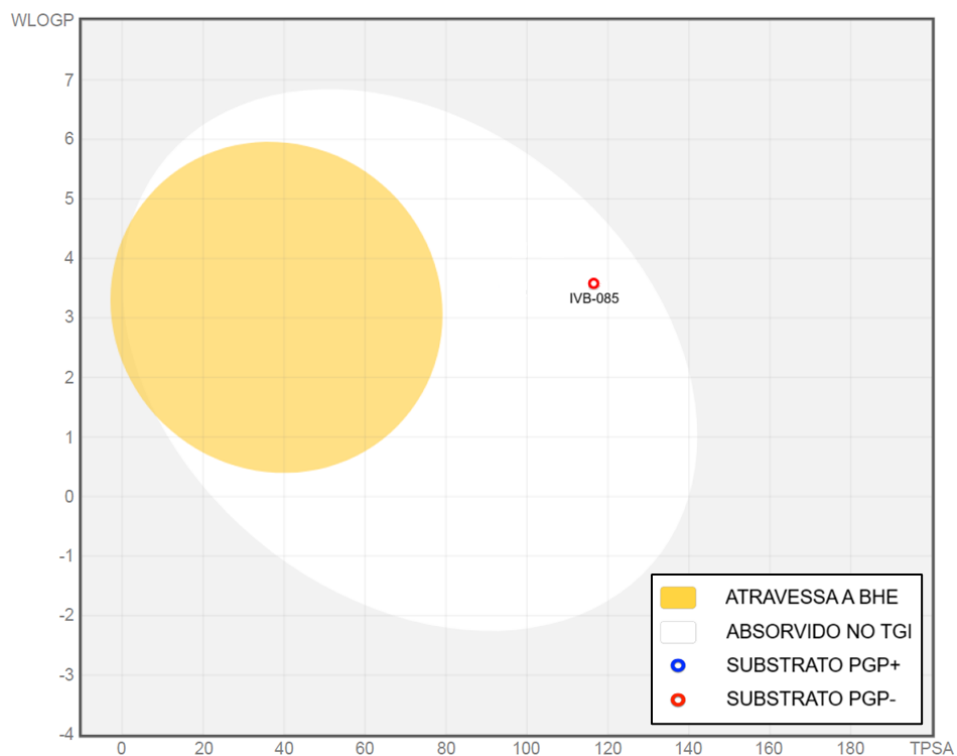
Quadro 9 – Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas estimadas por análise *in silico* para o composto LZG-085.

Massa Molecular (g/mol)	493.51
N° de ligações rotacionáveis	8
N° de grupos doadores de ligação de hidrogênio	2
N° de grupos aceptores de ligação de hidrogênio	7
Área de superfície polar topológica	116.48
logP	4.06
Violações das regras de Lipinski	Nenhuma
logS (Modelo ESOL)	-5.81
Classe de Solubilidade (Modelo ESOL)	Moderadamente solúvel

Absorção no TGI	ALTA
Permeia BHE	NÃO
Substrato da glicoproteína-P	NÃO
Inibidor da CYP2C19	SIM
Inibidor da CYP2C9	SIM
Inibidor da CYP3A4	SIM

Fonte: SwissADME (2024)

Figura 24 – Gráfico BOILED-EGG para o composto LZG-085.



Fonte: Adaptado de SwissADME (2024)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo este trabalho, mediante execução dos estudos de modelagem, cujos protocolos foram devidamente validados conforme a literatura atual, não foi prevista inibição do inflamassomo NLRP3 para os compostos isatínicos-hidrazônicos planejados. Apesar do desempenho inicial na ancoragem ser promissor, as simulações de dinâmica molecular esclareceram sobre a instabilidade da maioria dos compostos testados neste alvo, ao passo que os cálculos de MM-PBSA revelaram uma fraca ligação ao sítio ativo deste receptor. Entretanto, foi encontrado bom desempenho na inibição da enzima mPGES-1, confirmando as limitações da ancoragem molecular quando aplicada isoladamente para estudos de modelagem, já que nenhum dos compostos tinha atividade prevista de acordo com esta técnica.

De acordo com os resultados da modelagem molecular, o composto LZG-085 demonstrou-se mais promissor como *hit*, ou seja, um candidato a novo fármaco que apresentou potencial atividade biológica. Sua estabilização suficiente do alvo e permanência no sítio ativo foi constatada pelas simulações de dinâmica molecular e cálculos de MM-PBSA, conforme as interações intermoleculares previstas na ancoragem, que foram consistentes com os componentes energéticos integrantes da sua energia livre de ligação à enzima.

As propriedades farmacocinéticas relativas à absorção e distribuição foram suficientes, apesar do composto não ser previsto para agir no sistema nervoso central. Entretanto, a alta reatividade prevista alerta para necessidade de mudanças em sua estrutura, a fim de estabilizá-lo contra reações metabólicas, às quais LZG-085 mostrou-se bastante vulnerável. A fim de confirmar a possível inibição de mPGES-1 e NLRP3 pelo composto LZG-085, bem como suas propriedades farmacocinéticas previstas, este deverá passar por estudos posteriores, que incluam ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABDOLMALEKI, A.; GHASEMI, J.; GHASEMI, F. Computer Aided Drug Design for Multi-Target Drug Design: SAR /QSAR, Molecular Docking and Pharmacophore Methods. **Current Drug Targets**, v. 18, n. 5, p. 556–575, 2017.
- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.
- ADAK, D. et al. Isatin: A Multifunctional Heterocyclic Moiety With Promising Anti-Inflammatory Activity. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 7, p. 1878–1895, 26 jul. 2024.
- ALBINO, S. L. et al. ACW-02 an Acridine Triazolidine Derivative Presents Antileishmanial Activity Mediated by DNA Interaction and Immunomodulation. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 2, p. 204, jan. 2023.
- ALESSANDRI, A. L. et al. **Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development.** **Pharmacology and Therapeutics**, ago. 2013.
- ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. **Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation.** **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, dez. 2012.
- BARNETT, K. C. et al. **A 360° view of the inflammasome: Mechanisms of activation, cell death, and diseases.** **Cell.** Elsevier B.V., 25 maio 2023.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997.
- BATEMAN, A. et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D523–D531, 6 jan. 2023.
- BECHELLI, S.; DELHOMMELLE, J. AI's role in pharmaceuticals: Assisting drug design from protein interactions to drug development. **Artificial Intelligence Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 100038, jun. 2024.
- BERGQVIST, F.; MORGENSTERN, R.; JAKOBSSON, P. J. **A review on mPGES-1 inhibitors: From preclinical studies to clinical applications.** **Prostaglandins and Other Lipid Mediators.** Elsevier Inc., 1 abr. 2020.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.
- BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, v. 180, p. 114147, out. 2020.

BIOVIA DASSAULT SYSTÈMES. **Discovery Studio Visualizer**. Accelrys software inc. San Diego, BIOVIA, Dassault Systèmes, 2005.

BROOKS, B.; KARPLUS, M. Harmonic dynamics of proteins: normal modes and fluctuations in bovine pancreatic trypsin inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 21, p. 6571–6575, nov. 1983.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 187–217, 7 jun. 1983.

BRUNTON, L.; KNOLLMANN, B.; HILAL-DANDAN, R. **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**. 13. ed. Nova Iorque: McGraw Hill Medical, 2017.

CAO, J. F. et al. Molecular docking and molecular dynamics study Lianhua Qingwen granules (LHQW) treats COVID-19 by inhibiting inflammatory response and regulating cell survival. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 24 nov. 2022.

CAVAILLON, J.-M. Once upon a time, inflammation. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, 2021.

CHANG, T.-T. et al. Drug design for mPGES-1 from traditional Chinese medicine database: A screening, docking, QSAR, molecular dynamics, and pharmacophore mapping study. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 4, p. 580–591, jul. 2011.

CHEMAXON. **MarvinSketch 22.16.0**. Disponível em: <<https://chemaxon.com/marvin>>. Acesso em: 11 maio. 2023.

COLL, R. C. et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 6, p. 556–559, 2019.

COLLING, M. E.; TOURDOT, B. E.; KANTHI, Y. Inflammation, Infection and Venous Thromboembolism. **Circulation Research**, v. 128, n. 12, p. 2017–2036, 11 jun. 2021.

CUMMINS, E. P.; TAYLOR, C. T. Hypoxia and inflammation. **The Biochemist**, v. 39, n. 4, p. 34–36, 1 ago. 2017.

CUNNINGHAM, C. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 71–90, 6 jan. 2013.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, 3 mar. 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, p. 1117–1121, 2016.

DEKKER, C. et al. Crystal Structure of NLRP3 NACHT Domain With an Inhibitor Defines Mechanism of Inflammasome Inhibition. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 24, p. 167309, 3 dez. 2021.

DI, L. et al. Evidence-based approach to assess passive diffusion and carrier-mediated drug transport. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 15–16, p. 905–912, ago. 2012.

DI MICCO, S. et al. Discovery of new potent molecular entities able to inhibit mPGES-1. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1419–1427, 1 jan. 2018.

DOS SANTOS NASCIMENTO, I. J.; DE AQUINO, T. M.; DA SILVA JÚNIOR, E. F. Computer-Aided Drug Design of Anti-inflammatory Agents Targeting Microsomal Prostaglandin E 2 Synthase-1 (mPGES-1). **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 33, p. 5397–5419, 18 mar. 2022.

EIRÓ, N. Inflammation and cancer. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 4, n. 3, p. 62, 2012.

ELLULU, M. S. et al. Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. **Archives of Medical Science**, v. 13, n. 4, p. 851–863, 2017.

ELOKELY, K. M.; DOERKSEN, R. J. Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 8, p. 1934–1945, 26 ago. 2013.

ERENSOY, G. et al. Synthesis, in vitro and in silico studies on novel 3-aryloxymethyl-5-[(2-oxo-2-arylethyl)sulfanyl]-1,2,4-triazoles and their oxime derivatives as potent inhibitors of mPGES-1. **Journal of Molecular Structure**, v. 1272, p. 134154, 15 jan. 2023.

FELTES, B. C.; VERLI, H. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.

FERRARA, P. et al. New Developments and Applications of Docking and High-Throughput Docking for Drug Design and in silico Screening. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 2, n. 1, p. 83–91, 2006.

FLORIS, F.; TOMASI, J. Evaluation of the dispersion contribution to the solvation energy. A simple computational model in the continuum approximation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 616–627, 7 jul. 1989.

FU, J.; WU, H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 41, p. 301–316, 2023.

FUREY, W. et al. Programs and program systems in wide use. Em: **International Tables for Crystallography**. Chester, England: International Union of Crystallography, 2006. p. 695–743.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, 1 dez. 2019.

GENHEDEN, S.; RYDE, U. **The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. Expert Opinion on Drug Discovery** Informa Healthcare, , 1 maio 2015a.

GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449–461, 1 maio 2015b.

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of inflammation. Em: **Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press Inc., 2018. v. 1803p. 57–79.

GUPTA, A.; CHAUDHARY, N.; APAROY, P. MM-PBSA and per-residue decomposition energy studies on 7-Phenyl-imidazoquinolin-4(5H)-one derivatives: Identification of crucial site points at microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) active site. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 352–359, 1 nov. 2018.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, p. 17, 13 dez. 2012.

HE, S. et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 exhibits one-third-of-the-sites reactivity. **Biochemical Journal**, v. 440, n. 1, p. 13–21, 15 nov. 2011.

HEVENER, K. E. et al. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 444–460, 23 fev. 2009.

HOCHHEISER, I. V. et al. Structure of the NLRP3 decamer bound to the cytokine release inhibitor CRID3. **Nature**, v. 604, n. 7904, p. 184–189, 7 abr. 2022.

HOLLENBERG, P. F. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. **Drug Metabolism Reviews**, v. 34, n. 1–2, p. 17–35, 15 jan. 2002.

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. **Molecular Dynamics Simulation for All**. NeuronCell Press, , 19 set. 2018.

HOMMEYER, N.; GOHLKE, H. Free energy calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area method. **Molecular Informatics**, v. 31, n. 2, p. 114–122, 2012.

HORNAK, V. et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 3, p. 712–725, 15 nov. 2006.

HUANG, S. et al. New Era in Drug Interaction Evaluation: US Food and Drug Administration Update on CYP Enzymes, Transporters, and the Guidance Process. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 6, p. 662–670, 7 jun. 2008.

ISING, C. et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. **Nature**, v. 575, n. 7784, p. 669–673, 28 nov. 2019.

JAROENLAPNOPPARAT, A.; BHATIA, K.; COBAN, S. Inflammation and Gastric Cancer. **Diseases**, v. 10, n. 3, p. 35, 22 jun. 2022.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

KAUR, P.; KHATIK, G. An Overview of Computer-aided Drug Design Tools and Recent Applications in Designing of Anti-diabetic Agents. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 10, p. 1158–1182, 20 nov. 2020.

KAUSAR, T.; NAYEEM, S. M. Identification of small molecule inhibitors of ALK2: a virtual screening, density functional theory, and molecular dynamics simulations study. **Journal of Molecular Modeling**, v. 24, n. 9, 1 set. 2018.

KELLEY, N. et al. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, 1 jul. 2019.

KIM, S. et al. PubChem 2023 update. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D1373–D1380, 6 jan. 2023.

KONG, P. et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. abr. 2022, p. 131.

KUKLISH, S. L. et al. Characterization of 3,3-dimethyl substituted N-aryl piperidines as potent microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 19, p. 4824–4828, out. 2016.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Kumar Basic Pathology, E-Book: Robbins & Kumar Basic Pathology, E-Book**. 11. ed. Philadelphia: Elsevier, 2022.

LAI, H. T. T.; DO, H. M.; NGUYEN, T. T. **Evaluation of Colchicine's interaction with the ATP-binding region of mice NLRP3-NACHT domain using molecular docking and dynamics simulation**. Journal of Physics: Conference Series. **Anais...**Institute of Physics, 20 maio 2022.

LARSSON, K.; JAKOBSSON, P. J. Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 as targeted therapy in cancer treatment. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 120, p. 161–165, 1 jul. 2015.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. **Chapter 21.4. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.dl.ac.uk/CCP/CCP4/main.html>.

LIN, J. H.; YAMAZAKI, M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 1, p. 59–98, 2003.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997.

LIU, H. et al. Inflammation-targeted sialic acid-dexamethasone conjugates for reducing the side effects of glucocorticoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 622, p. 121–900, 25 jun. 2022.

MAHAL, A. et al. Molecular docking, drug-likeness and DFT study of some modified tetrahydrocurcumins as potential anticancer agents. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 32, n. 1, p. 101889, jan. 2024.

MALIYAKKAL, N. et al. Synthesis, biochemistry, and in silico investigations of isatin-based hydrazone derivatives as monoamine oxidase inhibitors. **Applied Biological Chemistry**, v. 67, n. 1, 1 dez. 2024.

MANGAN, M. S. J. et al. **Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases**. **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Publishing Group, , 2018.

MATUSZEK, A. M.; REYNISSON, J. Defining Known Drug Space Using DFT. **Molecular Informatics**, v. 35, n. 2, p. 46–53, 1 fev. 2016.

MEDINA-RODRIGUEZ, E. M.; BEUREL, E. Blood brain barrier and inflammation in depression. **Neurobiology of Disease**, v. 175, n. October, p. 105926, dez. 2022.

MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation**. **Nature** Nature Publishing Group, 24 jul. 2008a.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008b.

MEDZHITOV, R. The spectrum of inflammatory responses. **Science**, v. 374, n. 6571, p. 1070–1075, 2021.

MEHDI, S. et al. A review on linking stress, depression, and insulin resistance via low-grade chronic inflammation. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 36, n. August, p. 101571, 1 dez. 2023.

MELNIKOVA, I. **Future of COX2 inhibitors**. **Nature Reviews Drug Discovery**, jun. 2005.

MENEZES, K. J. DA S. et al. Molecular Dynamics Simulations and Binding Free Energy Calculations to Discover New Insights into NLRP3 Inhibitors. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 21, 28 jun. 2024.

MEZZAROMA, E.; ABBATE, A.; TOLDO, S. **NLRP3 inflammasome inhibitors in cardiovascular diseases**. **Molecules**MDPI AG, , 2 fev. 2021.

MILLER, B. R. et al. MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 11 set. 2012.

MITCHELL B.O., J. B. O. **Machine learning methods in chemoinformatics**. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**Blackwell Publishing Inc., 2014.

MOORE, N. et al. Pharmacoeepidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Therapie**, v. 74, n. 2, p. 271–277, abr. 2019.

NALBAN, N. et al. A comprehensive computational study of Millets derived phytochemicals as potential inhibitors of NACHT domain of NLRP3 inflammasome: Molecular docking, molecular dynamics simulation, MM-PBSA free energy calculation and DFT analysis. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 61, n. 4, p. 223–231, 2024.

NASCIMENTO, I. J. DOS S. et al. Insights on Microsomal Prostaglandin E2 Synthase 1 (mPGES-1) Inhibitors using Molecular Dynamics and MM/PBSA Calculations. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 21, n. 6, p. 1033–1047, maio 2024.

NASCIMENTO, I. J. DOS S.; AQUINO, T. M. DE; SILVA JÚNIOR, E. F. DA. Computer-Aided Drug Design of Anti-inflammatory Agents Targeting Microsomal Prostaglandin E 2 Synthase-1 (mPGES-1). **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 33, p. 5397–5419, 18 mar. 2022.

NASCIMENTO, I. J. DOS S.; AQUINO, T. M. DE; SILVA-JÚNIOR, E. F. DA. Repurposing FDA-approved Drugs Targeting SARS-CoV2 3CL pro : A Study by Applying Virtual Screening, Molecular Dynamics, MM-PBSA Calculations and Covalent Docking . **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 19, n. 7, p. 637–653, jul. 2022a.

NASCIMENTO, I. J. DOS S.; AQUINO, T. M. DE; SILVA-JÚNIOR, E. F. DA. The New Era of Drug Discovery: The Power of Computer-aided Drug Design (CADD). **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 19, n. 11, p. 951–955, 6 nov. 2022b.

NATH, R. et al. Isatin containing heterocycles for different biological activities: Analysis of structure activity relationship. **Journal of Molecular Structure**, v. 1222, 15 dez. 2020.

NATHAN, C.; DING, A. **Nonresolving Inflammation**. **Cell**. Elsevier B.V., 2010.

NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73–78, jan. 2012.

NEESE, F. **Software update: The ORCA program system—Version 5.0**. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science John Wiley and Sons Inc, , 1 set. 2022.

OKIN, D.; MEDZHITOV, R. **Evolution of inflammatory diseases**. **Current Biology**, 11 set. 2012.

ORAY, M. et al. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert opinion on drug safety**, v. 15, n. 4, p. 457–65, 2016.

ORDUÑA-VALLS, J. M. et al. Characteristics of particulate and non-particulate corticosteroids. Indications for their use in chronic pain treatments. **Revista española de anestesiología y reanimación**, v. 63, n. 6, p. 333–46, 2016.

PANTSAR, T.; POSO, A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1899, 30 jul. 2018.

PATIL, S. M. et al. Computational screening of benzophenone integrated derivatives (BIDs) targeting the NACHT domain of the potential target NLRP3 inflammasome. **Advances in Cancer Biology - Metastasis**, v. 5, 1 out. 2022.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

PETTERSSON, P. L.; THORÉN, S.; JAKOBSSON, P. J. **Human microsomal prostaglandin E synthase 1: A member of the MAPEG protein superfamily**. **Methods in Enzymology** Academic Press Inc., , 2005.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.

QUE, X. et al. **Fantastic voyage: The journey of NLRP3 inflammasome activation**. **Genes and Diseases**, 2024.

RADHI, A. H. HOMO-LUMO Energies and Geometrical Structures Effect on Corrosion Inhibition for Organic Compounds Predict by DFT and PM3 Methods. **NeuroQuantology**, v. 18, n. 1, p. 37–45, 30 jan. 2020.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.

RITTER, J. M. et al. **Rang & Dale's Pharmacology**. 8. ed. London: Churchill Livingstone, 2014.

ROCHE, V. F. et al. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 7^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2019. v. 1

SANTOS NASCIMENTO, I. J. DOS; AQUINO, T. M. DE; SILVA-JÚNIOR, E. F. DA. Molecular Docking and Dynamics Simulations Studies of a Dataset of NLRP3 Inflammasome Inhibitors. **Recent Advances in Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 16, jan. 2022.

SECOLI, S. R. Polifarmácia: interações e reações adversas no uso de medicamentos por idosos. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 63, n. 1, p. 136–140, fev. 2010.

SHOLL, D. S.; STECKEL, J. A. **Density Functional Theory: A Practical Introduction**. 1. ed. Hoboken: Wiley Interscience, 2009.

SILVA, R. J. D. **Planejamento e síntese de novos derivados N-fenilacrilamidas e N-acilidrazônico utilizando ferramentas da Química Medicinal, e suas avaliações como potenciais agentes anti-inflamatórios**. Dissertação—Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, 31 mar. 2023.

SILVA, Y. M. S. DE M. **Planejamento, síntese, avaliação in silico e in vitro de potenciais fármacos anti-inflamatórios e antiasmáticos a partir de scaffolds híbridos isatínicos hidrazônicos**. Tese de Mestrado—Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, 2024.

SLUTER, M. N. et al. **The inducible prostaglandin E synthase (mPGES-1) in neuroinflammatory disorders**. **Experimental Biology and Medicine** SAGE Publications Inc., , 1 maio 2023.

SONG, C. M.; LIM, S. J.; TONG, J. C. Recent advances in computer-aided drug design. **Briefings in Bioinformatics**, v. 10, n. 5, p. 579–591, 1 set. 2009.

TAN, C.; TAN, Y.-H.; LUO, R. Implicit Nonpolar Solvent Models. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 42, p. 12263–12274, 1 out. 2007.

TAPIA-ABELLÁN, A. et al. MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 6, p. 560–564, 2019.

TEAM, G. D. **Grace Plotting Tool**. Disponível em: <<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>>. Acesso em: 9 abr. 2024.

TERZIĆ, J. et al. Inflammation and Colon Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2101–2114, maio 2010.

TIAN, S. et al. **The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research**. **Advanced Drug Delivery Reviews** Elsevier B.V., , 23 jun. 2015.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Drug Development and Drug Interactions - Table of Substrates, Inhibitors and Inducers**. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>>. Acesso em: 10 nov. 2024.

V. STANKOV, S. Definition of Inflammation, Causes of Inflammation and Possible Anti-inflammatory Strategies. **The Open Inflammation Journal**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 27 jul. 2012.

VALDÉS-TRESANCO, M. S. et al. Gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 12 out. 2021.

VELCICKY, J. et al. Discovery of Potent, Orally Bioavailable, Tricyclic NLRP3 Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 1544–1562, 25 jan. 2024.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, 1 ago. 2003.

WANG, J. et al. Reducing Grid Dependence in Finite-Difference Poisson–Boltzmann Calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 8, p. 2741–2751, 14 ago. 2012.

WANG, Z. et al. **NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity**Hindawi Limited, , 2020a.

WANG, Z. et al. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020b.

YE, N.; YANG, Z.; LIU, Y. Applications of density functional theory in COVID-19 drug modeling. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 5, p. 1411–1419, maio 2022.

ZARE, F. et al. A combination of virtual screening, molecular dynamics simulation, MM/PBSA, ADMET, and DFT calculations to identify a potential DPP4 inhibitor. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.

ZHANG, Y. Y. et al. **Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and its inhibitors: Molecular mechanisms and therapeutic significance. Pharmacological Research**Academic Press, , 1 jan. 2022.

ZHOU, S. et al. In Silico Observation of the Conformational Opening of the Glutathione-Binding Site of Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 9, p. 3839–3845, 23 set. 2019.

ZOETE, V. et al. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 11, p. 2359–2368, 3 ago. 2011.

