

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Nicolas Gabriel Martins Silva

Estudo do metabolismo do 7-nitroindazol: uma abordagem *in silico*

Florianópolis

2020

Nicolas Gabriel Martins Silva

Estudo do metabolismo do 7-nitroindazol: uma abordagem *in silico*

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Elenara Lemos Senna

Coorientadora: Dra. Angela Patricia França

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

SILVA, NICOLAS GABRIEL MARTINS

Estudo do metabolismo do 7-nitroindazol: uma abordagem
in silico / NICOLAS GABRIEL MARTINS SILVA ; orientador,
Profa. Dra. Elenara Lemos Senna, | coorientador, Dra. Angela
Patricia França, 2020.

55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. SEPSE. 3. 7-NITROINDAZOL. 4.
METABOLISMO. 5. IN SILICO. I. Senna, Profa. Dra. Elenara
Lemos. II. França, Dra. Angela Patricia. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela benevolência e força eterna, matriz de todo o universo.

A meus amados pais, Sérgio e Fabiana por me encorajarem desde sempre aos estudos, mesmo que através de pequenos castigos; que hoje sou muito grato.

Ao meu querido irmão Erick, companheiro em todos os momentos.

Aos meus avós, que me incentivaram, de várias formas, a fazer uma faculdade.

A minha incrível namorada, já farmacêutica, que sempre me apoiou. Sua companhia e seus conselhos me guiaram com muita ternura através de todos os momentos de dificuldade, que se tornaram apenas breves instantes com a sua presença.

Aos meus sogros, Aloísio e Aldanir, por todos os momentos de alegria e conselhos recebidos.

Ao meu cunhado, também Aloísio, por todas as risadas.

A minha professora e orientadora Elenara, pela oportunidade e conhecimentos repassados, pela receptividade no laboratório desde o primeiro momento.

A minha coorientadora Angela pela ajuda nos experimentos, nas correções e por estar sempre disposta a conversar.

A todos os integrantes e amigos que conheci no Laboratório e na Universidade, pela agradável convivência e acontecimentos que levarei na memória.

Aos amigos que conheço por mais de uma década: Carlos Eduardo, João Victor, Lucas Machado e Vinícius Falconi; sei que a nossa amizade será para sempre.

Aos amigos que conheço por um tempo menor, mas que são tão importantes quanto os anteriores: André Gonçalves, Bárbara Miguel, Cássio Ramos, Júlia Tholl, Lucas Landim, Eduardo Ottoni e Ramatis Freitas.

Aos membros da banca avaliadora, pela disponibilidade.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pela infraestrutura e por ter feito parte da minha história.

“Nossa vida é, em todo instante e antes de
tudo, consciência do que nos é possível.”
(ORTEGA Y GASSET, 1930)

RESUMO

A sepse é um problema mundial de saúde que afeta cerca de 30 milhões de pessoas anualmente. É definida como uma resposta desregulada do hospedeiro frente a um processo infeccioso associado à disfunção orgânica. Muitos trabalhos relatam o envolvimento do óxido nítrico (NO) no desenvolvimento da sepse, por meio de evidências do aumento dos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato em pacientes sépticos e no choque séptico. Embora o NO ou peroxinitrito apresentem ação bactericida, níveis plasmáticos excessivos são contraproduativos, como já evidenciado pelo seu envolvimento na hipotensão e hiporresponsividade à vasoconstritores e na redução da perfusão tecidual. O 7-nitroindazol (7-NI) é uma substância conhecida por sua capacidade de inibir seletivamente a enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1), ao se ligar reversivelmente ao grupo heme desta enzima, impedindo a ligação do cofator BH4 e competindo com a L-arginina. Estudo *in vivo* mostraram que o 7-NI foi eficaz em melhorar a resposta aos vasoconstritores na fase tardia da sepse, além de reduzir a mortalidade dos animais em modelo de CLP e pneumosepse. Apesar de ser promissor para o tratamento da sepse, estudos farmacocinéticos do 7-NI são escassos e não há relatos de estudos de metabolismo na literatura. Assim, este trabalho teve como objetivo por meio de estudo *in silico*, investigar as vias de metabolização e os prováveis metabólitos do 7-NI. Os possíveis sítios de metabolismo (SoMs) do 7-NI foram avaliados pelos softwares SMARTCyp e Rs-WebPredictor. Para a identificação dos prováveis metabólitos os softwares BioTransformer e MetaUltra foram empregados. Os resultados obtidos com o emprego dos softwares SMARTCyp e Rs-WebPredictor demonstraram que os principais SoMs estão localizados nas posições *orto*, *meta* e *para* em relação ao grupamento nitro do anel aromático. O software Rs-WebPredictor também indicou os nitrogênios do anel de cinco membros e o próprio grupo nitro como possíveis SoMs. Os metabólitos preditos pelos softwares Biotransformer e MetaUltra envolvem principalmente reações oxidação. Além disso, reações de conjugação também foram preditas pelo software MetaUltra. Os resultados obtidos no presente estudo poderão ser utilizados para orientar investigações futuras sobre as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas do 7-NI.

Palavras-chave: Sepse. 7-Nitroindazol. Estudos de metabolismo *in silico*.

ABSTRACT

Sepsis is a global health issue that affects more than 30 million people worldwide every year. Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. Several studies have reported the involvement of the nitric oxide (NO) in the sepsis, by the elevated circulating nitrite/nitrate, the stable byproducts of NO, observed in septic patients and septic shock. Although NO or peroxynitrite has bactericidal action, excessive plasma levels are counterproductive, as already evidenced by its involvement in hypotension and hyporesponsiveness to vasoconstrictors and in the reduction of tissue perfusion. The 7-nitroindazole (7-NI) is a substance known for its ability to selectively inhibit the enzyme neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) by reversibly binding to the heme group of this enzyme, preventing the binding of the BH₄ cofactor and competing with L-arginine. *In vivo* studies have demonstrated that 7-NI was able to improve the response to vasoconstrictors in the late stage of sepsis, in addition to reducing animal mortality in the CLP and pneumosepsis models. Despite being promising for the treatment of sepsis, pharmacokinetic studies are scarce and there are no reports of metabolism studies for 7-NI in the literature. Thus, in this study *in silico* metabolism studies were carried out to predict the metabolism pathways and probable metabolites of 7-NI. The possible sites of metabolism (SoMs) of the 7-NI were evaluated using the softwares SMARTCyp e Rs-WebPredictor. To identify the probable metabolites of 7-NI, the softwares BioTransformer e MetaUltra were employed. The results obtained by using both SMARTCyp and Rs-WebPredictor softwares demonstrated that the main SoMs for 7-NI are located in the *ortho*, *meta* or *para* positions of the aromatic ring, in relation to the nitro groups. Rs-WebPredictor software also predicted the nitrogens of the five-membered ring and the nitro group as possible SoMs. The metabolites identified were originated from oxidation reactions as predicted by BioTransformer and MetaUltra softwares. Besides, conjugation reactions were predicted by using MetaUltra software. The results obtained in the present study can be used to guide future investigations on the pharmacokinetic and toxicological properties of 7-NI.

Keywords: Sepsis, 7-Nitroindazole, *In silico* metabolism studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do 7-Nitroindazol.....	21
Figura 2. Principais mecanismos de transferência de fármacos através das barreiras epiteliais: (a) transporte transcelular passivo ou difusão passiva, (b) transporte mediado por carreadores de membrana, (c) permeação passiva paracelular e (d) transporte vesicular	23
Figura 3. Principais sítios de metabolismo do 7-NI obtidos a partir do software SMARTCyp. Em vermelho o átomo com maior probabilidade dentre os três (C2), em laranja o segundo (C6) e em amarelo o terceiro (C12).....	41
Figura 4. Resultados obtidos pelo uso do software Rs-WebPredictor, ilustrando os átomos selecionados como possíveis sítios de metabolização do 7-NI. Na figura, a cor vermelha indica o sítio de maior chance de metabolização, a laranja o segundo, e a amarela o terceiro.	42
Figura 5. Possíveis metabólitos do 7-NI formados a partir de reações de fase 1 obtidos pelo software Biotransformer.	44
Figura 6. Resultados obtidos na determinação in silico dos prováveis metabólitos do 7-NI pelo software MetaUltra: reações de hidroxilação.	45
Figura 7. Resultados obtidos na determinação in silico dos prováveis metabólitos do 7-NI pelo software MetaUltra: reações de N-oxidação, nitro redução e epoxidação.	46
Figura 8. Resultados obtidos na determinação in silico dos prováveis metabólitos do 7-NI pelo software MetaUltra: reações de glucuronidação.	47
Figura 9. Resultados obtidos na determinação in silico dos prováveis metabólitos do 7-NI pelo software MetaUltra: reações de acetilação e metilação.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. <i>Softwares</i> disponíveis para a predição do metabolismo em estudos <i>in silico</i> (Adaptado de PEACH <i>et al.</i> , 2014).....	37
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais reações de fase 1, sua fórmula estrutural e exemplos de fármacos que sofrem esse tipo de metabolismo.	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
CYP450	Citocromo P450
DFT	Teoria funcional da densidade (do inglês, Density Functional Theory)
IFN- γ	Interferon- γ
LPS	Lipopolissacarídeo
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOS-1 ou nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NOS-2 ou iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
NOS-3 ou eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
QSAR	Relação quantitativa estrutura/atividade (do inglês, Quantitative Structure-Activity Relationship)
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNC	Sistema Nervoso Central
SOFA	Avaliação Sequencial de Insuficiência de Órgãos (do inglês, Sequential Organ Failure Assessment)
SoM,	Sítios de metabolismo (do inglês, sites of metabolism)
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
7-NI	7-Nitroindazol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 SEPSE.....	18
2.2 ÓXIDO NÍTRICO NA SEPSE	19
2.3 7-NITROINDAZOL	21
2.4 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DOS FÁRMACOS.....	22
2.4.1 Absorção	22
2.4.2 Distribuição	24
2.4.3 Metabolismo	25
2.4.4 Excreção	28
2.5 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DOS FÁRMACOS	29
2.5.1 Ensaios de metabolismo <i>in silico</i>	31
2.5.1.1 <i>Métodos baseados na estrutura dos ligantes</i>	32
2.5.1.1.1 QSAR	33
2.5.1.1.2 Métodos baseados em modelos de farmacóforos	34
2.5.1.1.3 Métodos baseados no reconhecimento molecular	34
2.5.1.1.4 Métodos de mecânica quântica.....	34
2.5.1.2 <i>Métodos baseados na estrutura do receptor</i>	35
2.5.1.2.1 Docking Molecular	35
2.5.3. Predição dos metabólitos	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	38
4 METODOLOGIA	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 PREDIÇÃO DOS SÍTIOS DE METABOLISMO (SoMs)	40

5.2 PREDIÇÃO DOS METABÓLITOS DO 7-NI.....	43
6 CONCLUSÕES.....	49

1 INTRODUÇÃO

A sepse é um problema mundial que afeta cerca de 30 milhões de pessoas anualmente, um número exorbitante de óbitos e internações que atingem especialmente países subdesenvolvidos e as suas redes públicas de saúde. Tal condição clínica é definida como a presença de disfunção orgânica generalizada, decorrente de resposta imune desregulada do organismo frente a uma infecção - mais comumente de bactérias gram-negativas. O desafio do tratamento não está exclusivamente relacionado com o combate ao microorganismo infeccioso, uma vez que, o paciente séptico em sua fase inicial irá apresentar um estado hiperdinâmico, taquicardia, alto débito cardíaco, baixa resistência vascular sistêmica e hipoxemia e na fase tardia um quadro hipodinâmico com cianose, hipotensão, taquicardia com pulso filiforme, oligúria e diminuição do débito cardíaco. Estes quadros podem não normalizar mesmo com a eliminação do patógeno (DELANO; WARD, 2016)

Muitos trabalhos relatam o envolvimento do óxido nítrico (NO) no desenvolvimento da sepse, por meio de evidências do aumento dos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato, produtos do metabolismo do NO, em pacientes sépticos e em choque séptico. Embora o NO ou peroxinitrito apresentem ação bactericida, níveis plasmáticos excessivos são contraproduativos, como já evidenciado pelo seu envolvimento na hipotensão e hiporresponsividade a vasoconstritores e na redução da perfusão tecidual (ASSREUY, 2006). Desta forma, o desenvolvimento de estratégias que garantam a manutenção da pressão arterial em valores próximos ao fisiológico tem sido considerado um dos principais objetivos dos estudos realizados em todo o mundo para o tratamento da sepse.

O NO é sintetizado por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS), as quais utilizam a L-arginina como precursor. Atualmente, três isoformas das enzimas NOS já foram descritas na literatura, sendo divididas de acordo com sua atividade em constitutivas e induzível. As isoformas constitutivas são a neuronal (NOS-1 ou nNOS) e a endotelial (NOS-3 ou eNOS); portanto, a terceira isoforma é relatada como indutível (NOS-2 ou iNOS) (KORHONEN *et al.*, 2005). A NOS-1 é considerada a principal fonte de NO em células do SNC, encontrando-se amplamente distribuída pelo sistema nervoso central e periférico (GOTTI *et al.*, 2005). É também expressa nos músculos esqueléticos, cardíaco e liso, além de células da mácula densa e ilhotas pancreáticas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). O NO proveniente da isoforma neuronal está envolvido em importantes processos fisiológicos, atuando na plasticidade sináptica e

neurotransmissão no SNC, na dilatação de vasos sanguíneos nos músculos esqueléticos e na regulação autócrina da contratilidade cardíaca, entre outros (GOVERS; OESS, 2004). Assim, o desequilíbrio na produção do NO pela NOS-1 contribui para o desenvolvimento de processos patológicos (GOLAN *et al.*, 2000).

O 7-nitroindazol (7-NI) é uma pequena molécula heterocíclica – que contém um anel indazol e um grupamento nitro na posição 7 –, conhecida por sua capacidade de inibir seletivamente a enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1). Em uma pesquisa feita por Nardi e colaboradores (2014) com o intuito de melhorar a resposta aos vasoconstritores na fase tardia da sepse (resposta dependente da ação da NOS-1), a administração do 7-NI mostrou-se eficaz, porém, sua ação foi limitada devido ao curto tempo de meia-vida, cerca de 30 minutos na dose de 10 mg/kg. Além do curto tempo de meia-vida plasmático (~2 h), o 7-NI apresenta baixa solubilidade aquosa (BUSH; POLLACK, 2000), que limita a sua aplicação clínica. Em um estudo pioneiro, Barp (2016) desenvolveu nanoemulsões lipídicas contendo 7-NI, com o objetivo de contornar as limitações de baixa solubilidade aquosa e curto tempo de meia vida plasmática deste composto. Neste estudo foi mostrado que a nanoemulsão de 7-NI, aplicadas pela via intravenosa, reduziu a produção de NO pela NOS-1 de maneira prolongada em células de músculo liso A7r5. A nanoemulsão também mostrou ser capaz de prevenir em 40% a mortalidade dos animais, nos modelos de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e pneumosepse, enquanto que o 7-NI livre preveniu na mesma proporção apenas no modelo de sepse por CLP. Embora estes ensaios tenham sido de suma importância para as pesquisas de novas estratégias para reverter o quadro de sepse, estudos sobre a farmacocinética do 7-NI são escassos e não há conhecimento sobre o seu metabolismo (BUSH; POLLACK, 2000; FORSTERMANN; SESSA, 2011).

Estudos sobre o metabolismo de fármacos têm sido identificados com um fator decisório no sucesso ou fracasso do desenvolvimento de novos medicamentos, visto que impacta sobre muitos aspectos, incluindo biodisponibilidade, meia-vida plasmática e toxicidade. A identificação de metabólitos é uma peça chave, à medida que os processos de metabolização podem resultar em espécies reativas, tóxicas ou mesmo ativas (PEACH *et al.*, 2012; ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014). Consequentemente a predição dos possíveis sítios de metabolismo é útil para a compreensão da terapêutica de um composto e predição da sua toxicidade. Dentro das propriedades farmacocinéticas, o metabolismo mostra-se relevante, pois é composto por reações enzimáticas ordenadas capazes de provocar alterações estruturais nos fármacos a fim de torná-los mais hidrossolúveis, facilitando o processo de excreção. Estas reações enzimáticas ocorrem

primordialmente no fígado, porém podem acontecer em outros órgãos, como os rins e os pulmões (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001; VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; MODA, 2013).

O desenvolvimento de metodologias eficazes para a investigação da farmacocinética, e principalmente, do metabolismo, sempre foi uma das aspirações da indústria farmacêutica e dos cientistas ligados à área. Nos dias atuais, os ensaios pré-clínicos de metabolismo compreendem diversas metodologias *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Dentre as três citadas, os ensaios *in silico* são os mais recentes a serem desenvolvidos e estão em constante aperfeiçoamento. Estes utilizam da tecnologia computacional e o conjunto de conhecimentos de propriedades físico-químicas e biológicas para a predição das propriedades de um fármaco (VAVOUGIOS *et al.*, 2017). Estudos *in silico* se baseiam em ferramentas para prever o metabolismo baseado em interações dos fármacos com as enzimas do citocromo P450 (CYP450) e seus desfechos metabólicos, as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), características de solubilidade, permeabilidade e biodisponibilidade, e capacidade de indução das enzimas envolvidas no metabolismo e de transportadores, que podem afetar a concentração plasmática dos fármacos e levar ao prolongamento da ação ou aparecimento de efeitos adversos indesejáveis. Apesar de apresentarem limitações, estudos *in silico* constituem uma poderosa abordagem para reduzir os custos e o tempo para o desenvolvimento de medicamentos (KAZMI *et al.*, 2019).

Assim, considerando os aspectos acima mencionados, este trabalho tem como objetivo investigar as propriedades farmacocinéticas do 7-NI, dando ênfase na avaliação do seu metabolismo usando ferramentas *in silico*, como forma de contribuir para o avanço das pesquisas na busca de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da sepse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SEPSE

Historicamente, os primeiros relatos do uso da palavra “sepsis” remetem ao filósofo e médico grego Hipócrates (460 a.C - 360 a.C). Para o filósofo, o termo sepsis (σήψη) referia-se ao estado de putrefação e se contrapõe à pepsis (πέψις), relacionada com o estado de “consecção” e/ou “maturação”. O conceito se assemelha muito às concepções orientais de ying-yang, onde ambas as formas podem ocorrer simultaneamente em um indivíduo, sendo a sepsis maléfica ao corpo e à pepsis benéfica (MAJNO, 1991).

A sepsis é um problema de saúde mundial, atingindo tanto os países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento. Atualmente, estima-se que haja cerca de 31,5 milhões casos de sepsis e 19,4 milhões de sepsis severa no mundo com 5,3 milhões de mortes anualmente (FLEISCHMANN *et al.*, 2016). Um estudo feito por Rhee e colaboradores (2017) analisando mais de 400 hospitais nos Estados Unidos, demonstrou que a sepsis foi a responsável por cerca de 6% das internações de adultos, das quais 21% culminaram em morte. No Brasil, estimativas apontam a existência de aproximadamente 600 mil novos casos de sepsis a cada ano, sendo que as consequências da sepsis são responsáveis por 16,5% dos atestados de óbitos emitidos, ou seja, em torno de 250 mil casos anualmente (ILAS, 2015). Um estudo apontou que em um só dia, em cerca de 230 Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) brasileiras, aleatoriamente selecionadas de forma a representar de maneira adequada o conjunto de UTIs do país, 30% dos leitos foram ocupados por pacientes com sepsis ou choque séptico, com letalidade próxima dos 50% (ILAS, 2015). As diretrizes para tratamento do choque séptico são baseadas no tratamento da infecção com antibioticoterapia e administração de fluidos e fármacos para elevar a pressão arterial (DELINGER *et al.*, 2013). Entretanto, boa parte dos pacientes com choque séptico apresenta um quadro de hipotensão que não é revertido pela fluidoterapia ou pelos agentes vasoconstritores, o que explica a sua elevada letalidade (SINGER *et al.*, 2016).

De acordo com o 3º Consenso Internacional (também conhecido como Sepsis 3.0), a sepsis deve ser definida como uma resposta desregulada do hospedeiro frente a um processo infeccioso associado à disfunção orgânica. Assim, de acordo com esta definição, a sepsis indica uma fisiopatologia mais complexa do que a infecção associada a uma resposta inflamatória sistêmica. A gravidade da disfunção de órgãos pode ser avaliada por um aumento da pontuação de dois pontos

ou mais na Avaliação Sequencial de Insuficiência de Órgãos (SOFA; do inglês Sequential Organ Failure Assessment). O SOFA quantifica anormalidades de acordo com achados clínicos, dados laboratoriais ou intervenções terapêuticas (SINGER *et al.*, 2016).

Uma grande dificuldade com relação a sepse é sua complexa fisiopatologia e a inexistência de um tratamento específico e eficaz. O quadro clínico da doença é normalmente iniciado por bactérias Gram negativas, mas também pode ser causado por fungos, vírus ou parasitas. O desafio do tratamento não está exclusivamente relacionado com o combate ao micro-organismo infeccioso, uma vez que, o paciente séptico apresenta um estado hiperdinâmico, taquicardia, alto débito cardíaco, baixa resistência vascular sistêmica e hipoxemia, quadros que podem não normalizar mesmo com a eliminação do patógeno (TITHERADGE, 1999; JACOBI, 2002). Essas características são causadas por um conjunto de fatores expressos na sepse: uma inflamação exacerbada mediada pela ativação do sistema imune, pelo reconhecimento de múltiplos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs); a disfunção da barreira endotelial, que permite o extravasamento de líquidos e proteínas para dos vasos para os tecidos; e um estágio de hipercoagulação, por conta da ativação de plaquetas e das citocinas provindas da inflamação (LEVI *et al.*, 2013; HOTCHKISS *et al.*, 2016).

Pouco tempo depois do início da sepse, é possível que a doença evolua para um choque séptico. Tal condição, além de aumentar a taxa de mortalidade, é caracterizada pela hipotensão refratária à reposição volêmica com necessidade de administração de medicamentos vasoconstritores. A dificuldade de manter a pressão arterial maior que 65 mmHg, é extremamente danosa à vários órgãos e tecidos, sendo comum a falência de múltiplos órgãos (HOTCHKISS *et al.*, 2016; SINGER *et al.*, 2016).

2.2 ÓXIDO NÍTRICO NA SEPSE

Muitos trabalhos relatam o envolvimento do óxido nítrico (NO) no desenvolvimento da sepse, por meio de evidências do aumento dos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato, produtos do metabolismo do NO, em pacientes sépticos e em choque séptico. Embora o NO ou peroxinitrito apresentem ação bactericida, níveis plasmáticos excessivos são contraproduativos, como já evidenciado pelo seu envolvimento na hipotensão e hiporresponsividade a vasoconstritores e na redução da perfusão tecidual (NATHAN; HIBBS Jr, 1991). Desta forma, o desenvolvimento de estratégias que garantam a manutenção da pressão arterial em valores próximos ao fisiológico tem

sido considerado um dos principais objetivos dos estudos realizados em todo o mundo para o tratamento da sepse.

O NO é uma molécula gasosa, simples, inorgânica e incolor. É sintetizado por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS), as quais utilizam a L-arginina como precursor. A ligação entre o nitrogênio e o oxigênio permite a existência de um elétron livre em sua estrutura, o que o torna uma molécula muito reativa. Apesar de simples, possui papéis importantes em várias vias fisiológicas e patofisiológicas do organismo, como no controle da pressão sanguínea, na função plaquetária, na defesa do organismo (é um microbicida produzido pelos macrófagos), estando também presente na neurotransmissão (KORHONEN *et al.*, 2005).

Atualmente, três isoformas das enzimas NOS já foram descritas na literatura. Apesar das poucas diferenças estruturais, foram divididas de acordo com sua atividade em constitutivas e induzível. As isoformas constitutivas são: a neuronal (NOS-1 ou nNOS) e a endotelial (NOS-3 ou eNOS); portanto, a terceira isoforma é relatada como indutível (NOS-2 ou iNOS). Apesar de serem semelhantes estruturalmente, as NOS são reguladas de forma distinta. As formas constitutivas são expressas em condições normais do organismo, e para realizarem sua catálise, dependem do íon cálcio e da ligação com a calmodulina, produzindo óxido nítrico em concentrações baixas na ordem nanomolar (MARLETTA, 1994; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Ao contrário de suas formas constitutivas, a NOS-2 não é expressa em condições fisiológicas, sendo induzida principalmente por citocinas, como o interferon- γ (IFN- γ), o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 1 β , além das endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS), portanto, a produção de NO é constante quando ativada, e é capaz de atingir concentrações micromolares. Tendo em vista sua ação microbicida, acredita-se que na sepse a sua principal função seja a eliminação do patógeno, conseqüentemente a NOS-2 está presente em grandes quantidades nas células do sistema imune como os macrófagos e linfócitos T (GOVERS; OESS, 2004).

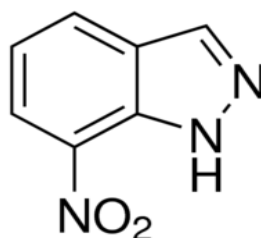
A NOS-1 é considerada a principal fonte de NO em células do sistema nervoso central (SNC), encontrando-se amplamente distribuída pelo sistema nervoso central e periférico (GOTTI *et al.*, 2005). É também expressa nos músculos esqueléticos, cardíaco e liso, além de células da mácula densa e ilhotas pancreáticas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Tendo em vista sua localização, o NO proveniente da isoforma neuronal está envolvido em importantes processos fisiológicos. Na sepse, estudos mostraram que a disfunção vascular está associada à maior expressão e associação física da óxido nítrico sintase e da guanilato ciclase e maior produção de

guanosina monofosfato cíclico. Adicionalmente, estes estudos mostraram que a inibição seletiva da NOS-1 restaura a resposta aos vasoconstritores (NARDI *et al.*, 2014).

2.3 7-NITROINDAZOL

O 7-NI é uma substância conhecida por sua capacidade de inibir seletivamente a enzima NOS-1. O 7-NI é uma pequena molécula heterocíclica que contém um anel indazol e um grupamento nitro na posição 7 (Figura 1). Age como inibidor seletivo *in vivo* da NOS-1 ao ligar-se reversivelmente ao grupo heme desta enzima, impedindo a ligação do cofator BH₄ (BUSH; POLLACK, 2000) e competindo com a L-arginina (KLATT *et al.*, 1994). Apesar de sua farmacocinética ter se mostrado dose-dependente em injeções intraperitoneais, o composto tem um tempo de meia vida curto, variando de 25 a 87 minutos. Mesmo após a administração de doses elevadas o tempo de meia vida não foi superior a duas horas (BUSH; POLLACK, 2000). Em uma pesquisa feita por Nardi e colaboradores (2014) com o intuito de melhorar a resposta aos vasoconstritores na fase tardia da sepse (resposta dependente da ação da NOS-1) a administração do 7-NI mostrou-se eficaz, porém sua ação foi limitada, devido ao curto tempo de meia-vida, cerca de 30 minutos na dose de 10 mg/kg.

Figura 1. Estrutura molecular do 7-Nitroindazol



Fonte: SigmaAldrich (2020)

Considerando as limitações de baixa solubilidade aquosa e curto tempo de meia vida plasmática do 7-NI, Barp e colaboradores (2018) desenvolveram nanoemulsões lipídicas contendo 7-NI para administração intravenosa. Ao investigar os efeitos da nanoemulsão contendo 7-NI em modelos de sepse, os autores demonstraram que a administração de 7-NI nanonemulsionado promoveu uma redução da mortalidade em 40% nos modelos de pneumosepse e de ligadura e perfuração do ceco (CLP), enquanto a administração de 7-NI livre teve efeito apenas no modelo de sepse por CLP.

Em suma, resultados anteriores mostraram que nanoemulsões melhoram o tempo de ação do 7-NI, consistindo em um veículo promissor para este composto na busca de novos tratamentos para a sepsé. No entanto, para o desenvolvimento de medicamentos inovadores, seguros e eficazes ainda são necessários estudos pré-clínicos, sobretudo para avaliação dos parâmetros farmacocinéticos, destacando-se os ensaios de metabolismo que, nesse caso, são escassos. Assim, a realização de estudos *in silico* para avaliar o metabolismo do 7-NI são de grande importância previamente aos estudos *in vitro* e *in vivo*, visto que a predição dos sítios de metabolismo e possíveis metabólitos são essenciais no desenvolvimento de medicamentos, e podem nortear os estudos futuros *in vivo* e *in vitro*.

2.4 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DOS FÁRMACOS

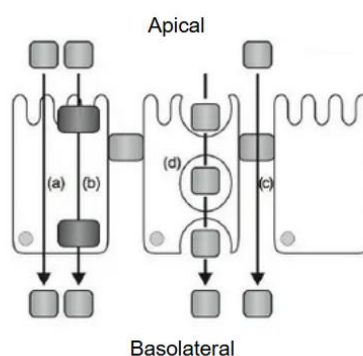
A farmacocinética é definida como o estudo do movimento do princípio ativo (fármaco) no corpo humano, desde a sua administração até atingir o sítio de ação para exercer o efeito terapêutico desejado (CAVALHEIRO; COMARELLA, 2016). A farmacocinética também pode ser compreendida como o estudo dos processos de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M) (biotransformação) e excreção (E) de um fármaco e do modo pelo qual esses processos determinam seu destino no organismo. Nesse contexto, é comum referir-se à farmacocinética como a disciplina dedicada ao estudo dos processos ADME. Cada um desses processos apresenta dois componentes: um cinético (refere-se à velocidade do movimento) e outro relacionado à extensão ou quantidade do fármaco envolvido no processo ou, ainda, à fração da dose absorvida, distribuída, metabolizada ou excretada (STORPITIS *et al.*, 2011). No processo de descoberta de novos medicamentos, a previsão da farmacocinética nos estágios iniciais da pesquisa é de extrema importância. A otimização destas propriedades é possível por meio de modificações na estrutura química das moléculas ou pela utilização de estratégias farmacotécnicas — as nanoemulsões por exemplo — que visam o não abandono do novo medicamento na etapa de avaliação clínica (WEN; JUNG; LI, 2015). O fracasso na fase clínica representa grandes perdas de tempo e dinheiro (BERNDT *et al.*, 2005).

2.4.1 Absorção

Antes que o fármaco possa exercer sua atividade ele deve ser absorvido, quando uma via extravascular é utilizada. Existem inúmeras vias de administração de fármacos, as quais possuem propriedades diversas e influenciam diretamente na absorção. No entanto, independente da via da

administração, a absorção de fármacos é dependente da sua permeabilidade pelas membranas e ocorre por duas rotas: a paracelular e a transcelular (Figura 2). O transporte paracelular ocorre quando um fármaco atinge a circulação ao passar pelo espaço intercelular, ou seja, o fármaco não atravessa diretamente a membrana, mas sim as junções intercelulares. É mais comum em fármacos pequenos e muito hidrossolúveis (TONZER; ROWLAND, 2006). A rota transcelular pode ocorrer de formas variadas; o transporte passivo transcelular, também chamado de difusão passiva é o mecanismo mais comum e corresponde a um fenômeno sem gasto de energia, que ocorre em função do gradiente de concentração. Um segundo processo sem gasto de energia é a difusão passiva facilitada onde o fármaco se liga a uma proteína de membrana a qual facilita o processo de difusão em favor do gradiente de concentração. Por outro lado, há moléculas que são transportadas com o gasto de energia por carreadores de membrana (STORPITIS *et al.*, 2011).

Figura 2. Principais mecanismos de transferência de fármacos através das barreiras epiteliais: (a) transporte transcelular passivo ou difusão passiva, (b) transporte mediado por carreadores de membrana, (c) permeação passiva paracelular e (d) transporte vesicular



Fonte: Adaptado de Storpitis *et al.*, (2011).

Entre as principais propriedades moleculares que influenciam a absorção de fármacos destacam-se a lipossolubilidade e a hidrossolubilidade. A lipossolubilidade refere-se à capacidade de uma substância de se solubilizar em uma fase oleosa, ou em lipídeos, portanto quanto maior for essa lipossolubilidade, mais facilmente os fármacos atravessam as membranas. Dessa forma, a hidrossolubilidade consiste na capacidade de uma substância em se dissolver em meio aquoso. De forma geral, para permear facilmente pela membrana um fármaco deve ser lipossolúvel, mas para ser absorvido o fármaco deve estar dissolvido em algum fluido corpóreo, logo ele deve apresentar um grau de hidrossolubilidade (TONZER; ROWLAND, 2006). Uma forma de se mensurar essa relação entre a lipossolubilidade e hidrossolubilidade é através do coeficiente de partição entre as

fases aquosa e orgânica (log P). Este coeficiente indica a tendência preferencial do fármaco se dissolver entre uma das fases. Caso o log P seja igual a zero, indica que o composto possui afinidade igual pelas duas fases, oleosa e aquosa; um log P menor que zero significa que a solubilidade é maior na fase aquosa; portanto, se o log P é maior que zero, o composto terá maior afinidade pela fase oleosa. Já é sabido que os valores ideais de logP estão entre 1 a 3, isso porque valores abaixo desse limite dificultam a permeação pela membrana plasmática (BARREIRO; FRAGA, 2015). Outras características ligadas diretamente ao fármaco que podem influenciar na absorção são: carga elétrica, massa molecular, estabilidade química e velocidade de dissolução (TONZER; ROWLAND, 2006).

2.4.2 Distribuição

O termo distribuição se refere à transferência reversível do fármaco de um local a outro do organismo. Após serem absorvidos, os fármacos atingem a circulação sistêmica e são rapidamente distribuídos devido à alta diferença de concentração que há entre o sítio de absorção e o sangue e tecidos. Em geral, a distribuição é desigual entre os tecidos em virtude de diferenças na perfusão sanguínea, ligação a tecidos (decorrente do conteúdo lipídico), pH regional e permeabilidade das membranas celulares (SMITH; VAN DE WATERBEEMD, 2001).

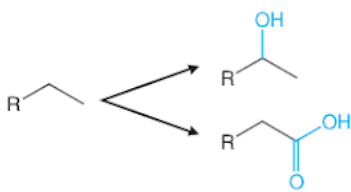
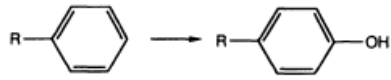
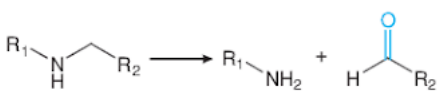
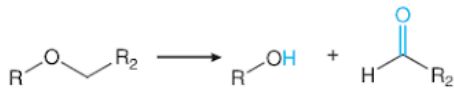



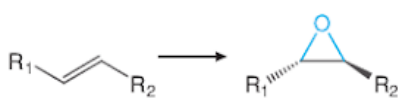
Uma das principais características do processo de distribuição é a extensão da ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas. Na corrente sanguínea, os fármacos são transportados parte em solução como fármaco livre (sem ligação) e parte com ligação reversível a componentes sanguíneos, como as proteínas plasmáticas (albumina e alfa-1-glicoproteína ácida, por exemplo). Esta é uma das principais propriedades que afetam a concentração dos fármacos na circulação e, tem papel direto na magnitude da ação farmacológico (MODA, 2013). Apenas o fármaco livre estará disponível para se difundir para os tecidos e assim exercer seus efeitos. Dessa forma, a concentração do fármaco livre na circulação sistêmica determina a concentração do fármaco no sítio de ação, afetando diretamente a sua eficácia. Além disso, fármacos muito lipofílicos tendem a acumular no tecido adiposo, o que pode prolongar sua ação. Os tecidos liberam o fármaco acumulado à medida que há uma diminuição em sua concentração plasmática (TOZER; ROWLAND, 2006).

2.4.3 Metabolismo

O metabolismo, também chamado de biotransformação, é um processo químico através do qual o organismo altera os fármacos, preparando-os para a eliminação. Embora o fígado seja o principal responsável pelo metabolismo dos fármacos, esse processo pode ocorrer fortuitamente nos pulmões, intestino, barreira hematoencefálica e rins. Por ser um fator de grande importância na administração de medicamentos, o metabolismo de fármacos é um processo complexo e muito estudado desde o século passado (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001).

O metabolismo ocorre comumente em duas fases distintas (I e II), cada qual com meios diferentes de atuação. A primeira fase é responsável pelas reações de oxidação, redução, ou hidrólise dos compostos com o objetivo de gerar metabólitos mais polares, facilitando assim a excreção (Tabela 1). As enzimas encarregadas pelas reações de primeira fase são as isoformas do citocromo P450 (CYP450), encontradas no retículo endoplasmático celular. Cerca de sete isoformas desta superfamília de enzimas são responsáveis por metabolizar mais de 90% dos fármacos existentes, são elas: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4. A CYP3A4 é a isoforma mais abundante no fígado e responsável por cerca de 50% do metabolismo dos fármacos conhecidos, e conseqüentemente, também é a mais estudada (DE GRAAF; VERMEULEN; FEENSTRA, 2005).

Tabela 1. Principais reações de fase 1, sua fórmula estrutural e exemplos de fármacos que sofrem esse tipo de metabolismo.

Reação	Fórmula estrutural	Exemplo de Fármaco
Hidroxilação alifática		Ibuprofeno, barbitúricos, ciclosporina
Hidroxilação aromática		Propranolol, fenitoína
N-Desalquilação		Imipramina, diazepam
O-Desalquilação		Indometacina, codeína
S-Oxidação		Omeprazol, cimetidina
N-Oxidação		Meperidina, quinidina
Dessulfuração		Tiopental
Formação de Epóxido		Carbamazepina

Nitro Redução



Cloranfenicol

 Fonte: Adaptado de GOLAN *et al.*, (2009).

A segunda fase do metabolismo (fase 2) compreende reações de conjugação: a glicuronidação, a acetilação, a sulfatação e a conjugação com glicina. De forma geral, compostos muito lipofílicos sofrem ambas as reações em sequência (fase I seguida da fase II), entretanto, ambas as fases podem ocorrer de forma independente. Muitas vezes, o fígado é o único responsável pela metabolização do fármaco e as enzimas transferases realizam boa parte das reações de fase II (WINTER, 2009). A glicuronidação, a reação mais comum da fase II, é a única que ocorre no sistema enzimático microsômico hepático. Os glucuronídeos são secretados na bile e eliminados na urina. Assim, a conjugação torna a maioria dos fármacos mais solúvel e facilmente excretada pelos rins. A conjugação com aminoácidos, como glutamina ou glicina, produz conjugados que são prontamente excretados na urina, mas não extensivamente secretados na bile, efeito semelhante ocorre com a acetilação e sulfatação (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001).

No processo de metabolização, que visa favorecer a eliminação dos fármacos, nem sempre os metabólitos gerados serão inativados. Os metabólitos podem apresentar maior ou menor potência, ou ainda, possuir uma toxicidade elevada em comparação ao princípio ativo original. Portanto, a partir desse fato, a indústria farmacêutica utilizou-se dessa peculiaridade para desenvolver fármacos que necessitam do metabolismo para serem tornarem ativos e exercerem sua ação farmacológica, os chamados de pró-fármacos. Ou seja, o fármaco ingerido só possuirá atividade farmacológica após sua metabolização no organismo. A codeína é um exemplo de pró-fármaco bem conhecido, é um derivado da morfina que foi isolado no século XIX e, no organismo, se converte em morfina para então promover seus efeitos terapêuticos (CHIN; FERREIRA, 1999).

O metabolismo, assim como as outras etapas da farmacocinética, está sujeito a interferência de fatores externos (farmacodinâmica, ambientais) ou internos (fisiológicos e genéticos). A genética do paciente afeta diretamente sua expressão enzimática e por ser um fator de grande variabilidade e ainda não muito explorado, é de difícil predição durante os ensaios clínicos. Alguns pacientes podem metabolizar um fármaco tão rapidamente que suas concentrações plasmáticas e

teciduais de eficácia terapêutica não são alcançadas; o inverso também é verosímil, o metabolismo pode ser tão lento que as doses habituais têm efeitos tóxicos. Os índices individuais de biotransformação de fármacos são influenciados por fatores não só genéticos, mas doenças existentes (em particular, hepatopatias) e interações entre fármacos, em especial as que envolvem indução ou inibição enzimática (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001).

Outros fatores incluem a interação entre o fármaco (o próprio, seus metabólitos ou outros fármacos administrados em conjunto) e as enzimas do metabolismo. Os compostos podem agir inibindo ou induzindo as enzimas, de forma que, muitas vezes, o próprio metabolismo seja afetado. Um grande exemplo desta peculiaridade são os fármacos antiepilépticos: fenitoínas, carbamazepina e fenobarbital, que atuam como indutores das enzimas do complexo CYP450. Essas fármacos aumentam a síntese proteica, que está associada com a proliferação do retículo endoplasmático liso e, em última análise, aumentam a capacidade de metabolização (FRENCH; GIDAL, 2000). Portanto, a possibilidade de prever tais interações é extremamente benéfica para nas etapas iniciais do desenvolvimento de fármacos.

Em relação ao fármaco de origem, os metabólitos ativos podem agir por mecanismos de ação similares ou diferentes, ou até mesmo por antagonismo. A compreensão do metabólito, sua estrutura e cinética, é de suma importância para avaliar a terapêutica e até mesmo prever a toxicidade de um fármaco (WILLIAMS; LEMKE, 2002). Devido a multiplicidade enzimática presente no metabolismo, é comum presenciar uma variedade de metabólitos originados de um mesmo composto sendo biotransformado por mais de uma enzima ao mesmo tempo. Portanto, tais metabólitos podem ser ativos ou inativos e apresentarem diferentes concentrações e velocidades de metabolização (PEREIRA, 2007). Ainda assim, algumas vias de metabolismo podem ser evidenciadas posteriormente com o uso crônico ou alguma alteração. O paracetamol, por exemplo, quando ultrapassa a dose terapêutica satura as vias de glicuronidação e sulfatação. Dessa forma, uma maior porcentagem do fármaco sofrerá oxidação sendo metabolizado no composto tóxico N-acetil-p-benzo-quinona imina (NAPBQI) (SEBBEN, *et al.* 2010).

2.4.4 Excreção

A excreção é caracterizada como a remoção irreversível do fármaco do organismo e ocorre principalmente pela via urinária. Entretanto, há casos em que o fármaco também é excretado pelas fezes, pela bile, pelo leite, pelo suor, pelo ar exalado pelos pulmões ou por outras secreções, sob a

forma inalterada ou modificada quimicamente (STORPITIS *et al.*, 2011). O sistema urinário mantém a composição e as propriedades dos líquidos do organismo por meio da depuração do sangue. Seu produto final é a urina, na qual são excretadas substâncias polares e hidrossolúveis. A formação da urina e a excreção de substâncias do organismo dependem de três mecanismos: filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular. Fármacos hidrossolúveis, carregados ionicamente, são filtrados nos glomérulos ou secretados nos túbulos renais, não sofrendo reabsorção tubular, pois tem dificuldade de atravessar as membranas. A velocidade do processo depende da fração livre do fármaco, taxa de filtração glomerular e fluxo plasmático renal. Os que são essencialmente secretados pelos túbulos renais utilizam a difusão simples (quando lipossolúveis) ou sistema de transporte ativo (STORPITIS *et al.*, 2011; WILLIAMS; LEMKE, 2002).

2.5 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DOS FÁRMACOS

Os principais objetivos de conduzir estudos de metabolismo incluem a identificação e caracterização dos principais metabólitos, identificação das enzimas responsáveis por seu metabolismo, e avaliação dos impactos dos metabólitos sobre a eficácia e segurança do composto testado (LIU e JIA, 2007a). Tais estudos podem ser conduzidos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. Estudos *in vivo* foram os primeiros empregados para prever quais fármacos ou metabólitos podem levar à toxicidade. Eles empregam espécies pequenas de animais, tais como camundongos, ratos, coelhos, cães e porcos da Índia, os quais permitem a avaliação da toxicidade aguda ou crônica. Entretanto, tais modelos apresentam limitações, sobretudo com respeito à pequena quantidade de xenobiótico que é administrada, de modo que o fármaco ou metabólitos apresentam uma baixa concentração no plasma ou urina, requerendo o uso de técnicas analíticas com baixo limite de detecção. Além disso, tais modelos exibem diferenças inter-espécies em relação aos seres humanos, além dos aspectos éticos envolvidos que têm sido criticados em relação ao bem-estar animal (COSTA; SARMENTO; SEABRA, 2014).

Atualmente, observa-se um avanço visando a substituição dos métodos *in vivo* de determinação do metabolismo de fármacos por técnicas *in vitro*. Esse progresso ocorre principalmente como reflexo do desenvolvimento tecnológico, por aspectos éticos e pela busca da redução do uso de animais na pesquisa. Os estudos *in vitro* visam prever os metabólitos prováveis no indivíduo, e geralmente utilizam-se para tal, fatias do fígado, o uso da fração S9, microsomas hepáticos,

superssomas e hepatócitos para realizar a busca do metabólito. Tais estudos permitem a simplificação da metodologia utilizada a um ambiente mais bem controlado (COSTA; SARMENTO; SEABRA, 2014; JIA; LIU, 2007a; MARQUES, 2013).

O microsoma hepático é uma fração subcelular do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, e é obtido através da homogeneização do fígado seguida por uma centrifugação diferencial. Este processo permite que os microsomas sejam compostos das enzimas do citocromo P450, flavina monoxigenases, carboxil transferases e glutathione S-transferases (JIA; LIU, 2007a; CARRÃO, 2015). Como todo método existente, os microsomas hepáticos apresentam vantagens e desvantagens. Por se tratar somente de uma fração do hepatócito, concentrada por uma ultracentrifugação, as condições experimentais devem ser extremamente controladas, pois fatores como pH do meio de incubação, força iônica e adição de solventes orgânicos podem influenciar os resultados. Adicionalmente, a presença de concentrações enzimáticas acima das encontradas em um fígado intacto ou a ausência de algumas enzimas hepáticas constituem limitações do uso desta metodologia, em estudos de metabolismo (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Em contrapartida, o baixo custo, a elevada estabilidade que possibilita um período longo de armazenamento, e a simplicidade metodológica fazem com que este método seja muito utilizado principalmente como um *screening* de metabólitos (MARQUES, 2013).

A fração hepática S9 é uma preparação contendo ambas as frações microsomal e citosólica. Assim como nos microsomas, há a necessidade de se suplementar o meio com os cofatores a fim de que o processo enzimático seja desencadeado, portanto, dependendo do cofator adicionado, têm-se as reações de Fase I ou de Fase II ou até uma combinação de ambas. A fração S9 é utilizada em associação com o Teste de Ames para detecção de mutagenicidade de produtos químicos. Sua desvantagem reside no fato de conter menor atividade enzimática comparativamente aos microsomas e superssomas (CALIXTO, 2012; MARQUES, 2013).

O superssoma é obtido por engenharia genética de células de inseto infectadas por baculovírus, o qual é capaz de expressar a isoforma desejada do citocromo P450 (CYP). Pode ser empregado em estudos de polimorfismos, bem como também na avaliação da interação entre fármacos. Uma importante questão feita é se estas isoformas possuem as mesmas características das que são naturalmente expressas no fígado. Comparações da atividade metabólica de

supersomas e microsomas sugerem que aqueles são um modelo razoavelmente preciso da situação *in vivo* (CALIXTO, 2012; MARQUES, 2013).

Um aspecto em comum aos ensaios de metabolismo *in vivo* e *in vitro* é a necessidade de possuir um método analítico, geralmente de cromatografia líquida, que seja suficientemente sensível, seletivo, reprodutível e robusto. Nos estudos *in vitro* e *in vivo*, amostras são coletadas em diferentes tempos. Os metabólitos são identificados pela comparação dos cromatogramas de amostras possivelmente contendo metabólitos e amostras sem metabólitos. Na preparação das amostras, é essencial a remoção de interferentes, tais como proteínas, sais e compostos endógenos que podem sobrecarregar a coluna cromatográfica e afetar a qualidade dos cromatogramas. Tais métodos envolvem a precipitação de proteínas e centrifugação das amostras, seguida por uma extração líquido-líquido ou em fase sólida (LIU; JIA, 2007b). Tais procedimentos podem resultar em estudos laboriosos que consomem tempo e recursos financeiros.

2.5.1 Ensaios de metabolismo *in silico*

Cada vez mais é possível observar grande investimento das indústrias farmacêuticas na busca de modelos inovadores de determinação do metabolismo de fármacos (TARCSAY; KESERU, 2001). O avanço da tecnologia computacional e ao mesmo tempo a concepção e entendimento das enzimas, seus sítios metabólitos e de técnicas moleculares, possibilitaram o surgimento de modelos preditivos sem a necessidade de realizar experimentos de bancada e que permitam a identificação de metabólitos de modo rápido, eficaz e com baixo custo. Neste sentido, estudos de metabolismo *in silico* vem ganhando grande destaque na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, sendo realizados com o auxílio de métodos computacionais e matemáticos (VAVOUGIOS *et al.*, 2017). Na literatura, métodos computacionais são usados para prever a biotransformação preferencial de candidatos a fármaco e uma série de sistemas especializados como CASE, COMPACT, DEREK, HazardExpert, MetaSite, METABOLEXPert e TOPKAT têm sido disponibilizados aos pesquisadores. Considerando que constitui tema do presente trabalho, este tópico será apresentado em um item a parte.

Existem várias ferramentas *in silico* para prever o metabolismo de fármacos. Com relação ao tipo de informação requerida para gerar os modelos que são capazes de fazer tais previsões, dois aspectos devem ser considerados: modelagem molecular e modelagem de dados. A

modelagem molecular demanda o conhecimento da estrutura tridimensional, enquanto a modelagem de dados pode ser empregada quando não há esta informação e os modelos podem ser construídos usando unicamente informações conhecidas dos substratos ou inibidores. Neste sentido, os métodos computacionais podem ser classificados em duas categorias: abordagens baseadas na estrutura dos ligantes (QSAR, Meteor, CoMFa, entre outros) e baseadas na estrutura do receptor, os quais usam informações do complexo enzima-substrato (ex., docking). A reatividade química e orientação do ligante no sítio ativo da enzima são muito importantes para a determinação do SoM (do inglês, *site of metabolism*). Alguns estudos associam as duas abordagens, gerando modelos híbridos. Além disso, métodos locais investigam sistemas biológicos simples, enquanto métodos globais tentam verificar o metabolismo de pequenas moléculas de um modo mais amplo, ou seja, as interações com várias enzimas (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

2.5.1.1 Métodos baseados na estrutura dos ligantes

Métodos baseados na estrutura dos ligantes partem do pressuposto que o metabolismo de um composto é exclusivamente uma consequência da sua estrutura química e de suas características. Estes métodos dependem de um conjunto de substratos ou inibidores conhecidos para construir modelos, fornecendo informações indiretas sobre os sítios ativos das enzimas. A forma, as propriedades eletrônicas e as conformações das moléculas são levadas em consideração, assumindo que tais características determinarão a rota metabólica do composto. Estes modelos são frequentemente dependentes da disponibilidade dos dados experimentais para um número suficientemente grande de substratos e devem lidar com incertezas acerca da cavidade de ligação de uma proteína. Entretanto, pequenas mudanças na estrutura de um xenobiótico não necessariamente resultam em mudanças significativas do seu metabolismo, provavelmente devido à alta flexibilidade e plasticidade das enzimas metabólicas (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

A predição de SoMs é uma das principais etapas durante o processo de investigação molecular. Ela possibilita a detecção de possíveis “hot spots” (pontos quentes) onde o metabolismo tem grandes chances de ocorrer, os quais também variam para cada enzima do complexo CYP450. Da mesma forma, estes “hot spots” da molécula podem ser modificados para obter um composto mais estável metabolicamente (RUDIK *et al.*, 2015). Para esta identificação, uma ampla variedade de ferramentas baseadas na estrutura dos ligantes é usada, tais como sistemas inteligentes, abordagens de mineração de dados, relações quantitativas de estrutura-atividade (QSAR),

algoritmos baseados em farmacóforos e técnicas com foco na reatividade, entre outros (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

2.5.1.1.1 QSAR

As análises de relação estrutura/atividade quantitativa (QSAR, *do inglês Quantitative Structure-Activity Relationship*) têm como principal objetivo a construção de modelos matemáticos que relacionam a estrutura química à atividade biológica de uma série de compostos análogos (ALMEIDA *et al.*, 2010). Esta técnica emprega descritores baseados em estruturas moleculares e utiliza de algoritmos computacionais para relacionar os descritores obtidos com o valor da propriedade alvo de interesse (MODA, 2013).

Inúmeros descritores são disponíveis, desde o uso de impressões digitais codificadas por fragmentos (*do inglês, fragment encoding fingerprints*) até descritores físico-químicos e computados a partir de arranjos espaciais de pontos de interação farmacofóricos. Os métodos QSAR podem ser divididos em quatro etapas: *(i)* a determinação ou coleta de propriedades biológicas de interesse, os parâmetros a serem avaliados, *(ii)* a geração de um descritor molecular e uma seleção de variáveis para que seja possível calcular variáveis independentes, *(iii)* validação e geração do modelo com testes lineares e não lineares, e *(iv)* a predição do metabolismo de novos compostos usando um *set* de validação externa (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014). Portanto o método QSAR, deve ser capaz de identificar e desvendar o fenômeno observado no complexo campo representado pelas interações entre a estrutura química e o seu alvo biológico (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Entretanto, grande parte das suas limitações se dá por conta da base de dados utilizada. Caso o objetivo do estudo seja gerar modelos capazes de fazerem amplas predições, a base utilizada deve conter uma grande variedade de modelos e estruturas distintas. Se os dados disponíveis forem semelhantes, o modelo só será capaz de prever compostos similares aos utilizados. Usando descritores apropriados, o uso de modelos QSAR é confiável para a investigação do metabolismo, mas por se tratar de algoritmos e bases de dados próprias, há uma lista extensiva a ser empregada nos estudos (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

2.5.1.1.2 Métodos baseados em modelos de farmacóforos

Um dos primeiros conceitos de farmacóforo surgiu em 1909 com a sugestão de que uma parte da estrutura da molécula seria o (*phoros*), essencial para a atividade biológica. No conceito atual, o farmacóforo compreende o conjunto de aspectos estruturais de uma molécula que é reconhecida por um sítio receptor e é responsável pela atividade biológica, incluindo a distribuição geométrica das características químicas, como os aceptores e doadores de hidrogênio, as funções hidrofóbicas alifáticas e aromática, entre outros (BASAK; RESTREPO; VILLAVECES, 2015).

Os modelos de farmacóforos tentam identificar, entre um conjunto de substratos/ inibidores conhecidos, características químicas comuns e o arranjo espacial 3D de uma molécula, características que sejam fatores chaves para desencadear a resposta biológica. O arquétipo resultante consiste em uma estrutura que descreve o tamanho e as propriedades eletrostáticas do sítio ativo. A conformação estrutural usada no modelo será a conformação bioativa da molécula e, dessa forma, o modelo utilizará o mesmo sítio de ligação para todas as moléculas investigadas. Portanto, esse método funciona somente dentro do espaço estrutural usada no conjunto, servindo para contemplar os diferentes padrões de ligação fármaco-enzima. Ao contrário do QSAR, esse geralmente é um procedimento qualitativo que ao estudar enzimas promíscuas como a CYP450 pode ter aplicação limitada (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014; BASAK; RESTREPO; VILLAVECES, 2015). O conhecimento da estrutura 3D do local de ligação, mesmo que não seja essencial, pode ser valioso na construção do modelo de farmacóforo ao identificar as regiões do espaço ocupadas pela proteína e, portanto, não estará disponível para o ligante (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

2.5.1.1.3 Métodos baseados no reconhecimento molecular

A base dos métodos com o foco na forma é que o reconhecimento molecular de um ligante por um determinado receptor é resultante da complementaridade da forma entre esse ligante e o local de ligação da macromolécula. Assim, moléculas que possuírem formas semelhantes devem ligar-se ao mesmo receptor. Esse modelo necessita apenas de uma molécula de referência para ser criado, pois a similaridade é quantitativamente mensurada em comparação ao ligante à ser investigado (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

2.5.1.1.4 Métodos de mecânica quântica

Os cálculos clássicos da interação entre enzima e substrato podem prover informações úteis quanto à conformação e à dinâmica da ligação. Porém, os métodos de mecânica quântica (QM) vão além, permitindo calcular a quebra de ligações ao incluir as descrições corretas dos elétrons nos átomos e moléculas. Em contra-partida, seu desenvolvimento e execução requer mais uso computacional de memória e processamento (CPU), elevando o custo e limitando seu uso. Existem dois tipos de QM: *ab initio* e semi-empírico. Enquanto o primeiro é baseado somente em equações e aproximações matemáticas, o segundo método substituí grande parte das equações por valores padronizados já obtidos, reduzindo assim o tempo para o cálculo, mas tornando-o mais impreciso (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

2.5.1.2 Métodos baseados na estrutura do receptor

Os modelos baseados na estrutura do receptor incluem não somente as propriedades do substrato, mas também explicitam o modelo de interações entre o ligante e a enzima em questão. Estudos de metabolismo baseados na estrutura do receptor permitem a predição dos modos de ligação dos substratos, o mecanismo de catálise e a elucidação das diferenças metabólicas de enantiômeros. Portanto estes métodos são usados para prever a geometria da ligação receptor-ligante para a predição dos SoMs. Para a realização de estudos *in silico* baseados na estrutura do receptor, estruturas das enzimas P450 ou outras são requeridas e podem ser experimentalmente determinadas por cristalografia de raio-X, ressonância magnética nuclear ou microscopia eletrônica. Por ser difícil adquirir um modelo 3D de alta resolução da estrutura enzimática, modelos homólogos foram criados se baseando elucidação de enzimas de outros mamíferos (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

2.5.1.2.1 Docking Molecular

Inicialmente, o *docking* molecular tinha como objetivo a investigação da ligação entre moléculas grandes e pequenas. No entanto, seu desenvolvimento permitiu a identificação de ligações de baixa energia dentro de um sítio ativo de uma macromolécula. Em estudos de metabolismo, é capaz de prever a conformação e orientação do substrato, revelando grupos chaves ou átomos para a ligação — aqueles que estiverem mais próximos dos resíduos catalíticos e do grupo heme — no complexo CYP (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014; PINZI, 2019).

O processo do docking molecular consiste em constantemente posicionar e classificar as moléculas dentro do sítio ativo. Este posicionamento é feito por algoritmos que busca as diferentes posições possíveis dos fármacos no sítio de ação. A classificação é calculada por uma função “*score*” que ordena as conformações favoráveis usando abordagens empíricas e baseadas em conhecimentos prévios para verificação da energia de ligação do complexo proteína-ligante. O *docking* molecular não consegue precisamente simular o processo biológico, visto que várias suposições são feitas por funções *score*. As principais limitações do *docking* incluem incapacidade de modelar com precisão o solvente, a entropia e a flexibilidade do alvo (LOHNING *et al.*, 2017). Por consequência o método não é apropriado para estimar a reatividade do fármaco, mas fornece informações relevantes quanto à afinidade de ligação do mesmo e à presença de efeitos estéricos, fornecendo assim informações confiáveis quanto à afinidade por um dado alvo e a regioseletividade de um ataque metabólico (ANDRADE; SILVA; BRAGA, 2014).

2.5.3. Predição dos metabólitos

Inicialmente, as plataformas para predição *in silico* envolviam somente os grandes bancos de dados de reações metabólicas (LANGOWSKI; LONG, 2002). De forma geral, essas bases de dados poderiam ser usadas em busca de alguma biotransformação específica, sua estrutura ou subestrutura. Apesar da vantagem de possuir os pormenores do metabolismo de origem e seus achados, sua aplicação era extremamente limitada caso uma estrutura similar à da busca não estivesse incluída na base de dados (LANGOWSKI; LONG, 2002).

Grande parte dos programas utilizados na predição do metabolismo e seus metabólitos utiliza a investigação da estrutura química da molécula (seja pelas ligações entre os átomos ou grupos funcionais) e aplicam normas de biotransformação de forma hierarquizada e programada (GOMBAR *et al.*, 2006). Portanto, a predição do metabolismo a partir desses *softwares* depende principalmente de seus algoritmos e os princípios usados para sua construção e, assim como os *softwares* baseados somente em bancos de dados, as normas de biotransformação utilizada são limitantes na predição do metabólito (GOMBAR *et al.*, 2006). Assim sendo, muitos dos *softwares* atuais misturam a investigação da estrutura química com a busca em grandes bases de dados próprias. Uma compilação dos *softwares* disponíveis para estudos de metabolismo *in silico* é apresentada no Quadro 1. O presente estudo analisou duas plataformas para a predição dos metabólitos: o BioTransformer e MetaUltra, ambos empregam bases de dados e algoritmos próprios para a predição.

Quadro 1. *Softwares* disponíveis para a predição do metabolismo em estudos *in silico* (Adaptado de PEACH *et al.*, 2014).

Nome	Fabricante/ Instituição	Predição	Método
ACD/Percepta	ACD Labs	Sítios de reações metabólicas, inibidores e substratos da CYP	QSAR
ADMET Descriptors/Collection	Accelrys	Inibição da CYP 2D6	QSAR
ADMET Predictor	Simulations Plus	Sítios de reações metabólicas, Substratos, inibidores e cinética da CYP, substratos da UGT e clearance	QSAR
ADMEworks Predictor	Fujitsu	Afinidades de ligação ao CYP	QSAR
Biotransformer	The Metabolomics Innovation Center (Canadá)	Biotransfomações	Base de dados, <i>machine learning</i> e regras.
CypScore	CAChe Research	Sítios de reações metabólicas	QSAR
isoCYP	Molecular Networks	Substratos da CYP	QSAR
MetabolExpert	CompuDrug	Biotransfomações	Regras de lógica
Metabolizer	ChemAxon	Biotransfomações	Enumeração de reações
MetaDrug	GeneGo	Biotransfomações, substratos e inibidores da CYP	QSAR
META-PC	MultiCASE	Biotransfomações	Fragmentação, aplicação de regras de direcionamento
MetaPrint2D	University of Cambridge (UK)	Sítios de reações metabólicas, Biotransfomações	Quantificação dos <i>Fingerprints</i>
MetaSite	Molecular Discovery	Sítios de reações metabólicas, Metabólitos	Alinhamento estrutural e cálculos semiempíricos
MetaUltra	MultiCase	Biotransfomações, probabilidade de ocorrência <i>in vivo</i>	QSAR, base de dados
METEOR	Lhasa	Biotransfomações	Aplicação de regras e raciocínio de lógica
MEXAlert	CompuDrug	Conjugação de primeira passagem	Aplicação de regras
P450 SOM	Schrödinger	Sítios de reações metabólicas	Docking mais regras
PASS	GeneXplain	Substratos, inibidores, indutores da CYP, substratos da fase II	QSAR
QikProp	Schrödinger	Número de biotransfomações	SMART matching
RS-Predictor	Rensselaer	Sítios de reações metabólicas	QSAR
SMARTCyp	University of Copenhagen (Denmark)	Sítios de reações metabólicas	Cálculos <i>ab initio</i> (fragmentos) e medições estruturais
StarDrop	Optibrium	Regiosseletividade, afinidade de ligação ao CYP	QSAR e cálculos semiempíricos
TIMES	Burgas 'Prof. Assen Zlatarov' University (Bulgaria)	Biotransfomações	Docking e QSAR

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as rotas de metabolização do 7-NI usando métodos *in silico*.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Identificar os sítios de metabolismo (SoM) do 7-NI usando ferramentas para estudos *in silico* disponíveis on line;
- Identificar as prováveis reações e metabólitos originados do metabolismo em fase 1 e fase 2 do 7-NI;
- Discutir e comparar as ferramentas de metabolismo *in silico* empregadas quanto ao tipo de informações disponibilizadas;
- Contribuir para o estudo das propriedades farmacocinéticas do 7-NI, fornecendo informações que poderão ser empregadas em estudos farmacológicos e de toxicidade *in vivo*.

4 METODOLOGIA

Para predição dos sítios de metabolismo (SoMs) do 7-NI foram empregadas as ferramentas online SmartCyp e Rs-WebPredictor. A SmartCyp foi desenvolvida pelos pesquisadores Marco Montefiori, Khanhvi Phuc Tran, Flemming Jørgensen, e Lars Olsen, da Universidade de Copenhagen (Dinamarca) e encontra-se disponível em <https://smartcyp.sund.ku.dk/> (RYDBERG *et al.*, 2010). A Rs-WebPredictor foi desenvolvida pela empresa Rensselaer Exploratory Center for Cheminformatics Research (RECCR, EUA) e é disponibilizada no site <http://reccr.chem.rpi.edu/Software/RS-WebPredictor/> (ZARETZKI *et al.*, 2010).

As rotas metabólicas e os prováveis metabólitos do 7-NI foram preditos pelo uso do software MetaUltra versão 1.2 (MultiCASE, Ohio, EUA), gentilmente disponibilizado para uso neste trabalho. Igualmente foi empregada a plataforma BioTransformer desenvolvida pelo The Metabolomics Innovation Center (TMIC, Canadá) e disponível para uso online em <http://biotransformer.ca/> (DJOUMBOU-FEUNANG *et al.*, 2019)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREDIÇÃO DOS SÍTIOS DE METABOLISMO (SoMs)

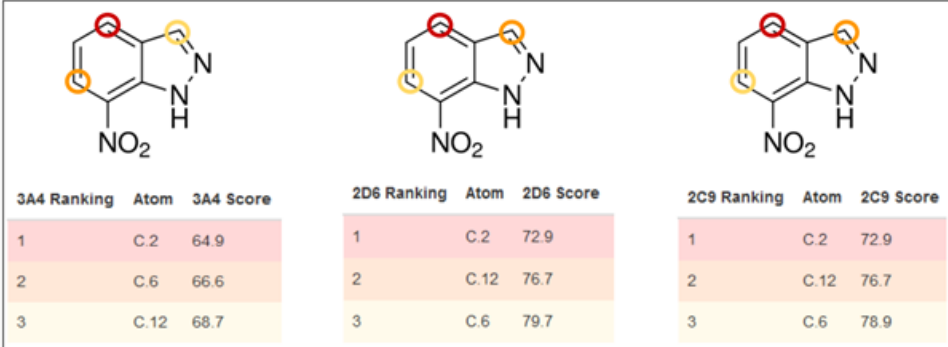
As isoenzimas do citocromo P540 são responsáveis pelo metabolismo de fase I de mais de 90% de todos os compostos comercializados. Estas isoenzimas catalisam várias reações de biotransformação, incluindo oxidação alifática e aromática, N- e O-dealquilação, S- e N-oxidação, formação de sulfona/sulfóxido, deaminação oxidativa, desulfuração e dehalogenação. O principal mecanismo de oxidação comum a todas as CYPs envolve a redução do oxigênio para formar espécies reativas de oxigênio e água, uma conversão catalisada pelo grupo heme situado no sítio ativo da enzima. Nos últimos anos, inúmeras abordagens têm sido desenvolvidas com o objetivo de prever o resultado do metabolismo de moléculas com vários graus de exatidão. Tais modelos preveem os sítios onde as reações ocorrem e são usados como um ponto de partida para a investigação das rotas metabólicas de um candidato à fármaco (ZARETSKI *et al.*, 2011).

O SMARTCyp é uma plataforma online de predição de quais sítios de uma molécula são mais sujeitos ao metabolismo pelo citocromo P450. Esta plataforma tem sido aplicada ao estudo do metabolismo pelas isoformas 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2E1 e 3A4 (CYP3A4), além das isoformas 2C9 e 2D6, as quais foram incluídas na versão 2.1. A SMARTCyp usa um algoritmo muito simples, o qual envolve um descritor de reatividade e um de acessibilidade. Tais algoritmos usam a energia de ativação do citocromo P450 necessária para reagir com uma molécula, que é calculada pela teoria funcional da densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*). Assim, neste método, as energias de ativação das CYPs que reagem com fragmentos de um ligante são usadas como referência da reatividade de um dado fragmento (RYDBERG *et al.*, 2010; PIECHOTA *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos a partir do uso da plataforma SMARTCyp (Figura 3) revelaram que os átomos a molécula do 7-NI com maior probabilidade de sofrerem o metabolismo são os C2, C6 e C12, correspondendo aos carbonos na posição *para* e *meta* ao grupo nitro e ao carbono ligado covalentemente ao nitrogênio do anel de cinco membros respectivamente. Ao avaliar a energia de ativação necessária para cada enzima, o software mostra um *score* para cada átomo do fármaco; os três átomos com menor *score* são os que apresentam maiores chances de serem metabolizados. O átomo C2, na posição *para* ao grupo nitro, foi o átomo que apresentou o menor *score* em todas as isoformas da CYP450. Os outros sítios, C6 e C12, intercalaram entre a segunda e terceira

posição (em laranja e amarelo respectivamente) conforme a isoforma avaliada. Ainda, o *software* não ignora o fato de existirem outros SoMs na molécula, entretanto, esses átomos apresentaram um *score* acima dos três átomos principais e não foram incluídos.

Figura 3. Principais sítios de metabolismo do 7-NI obtidos a partir do software SMARTCyp. Em vermelho o átomo com maior probabilidade dentre os três (C2), em laranja o segundo (C6) e em amarelo o terceiro (C12).

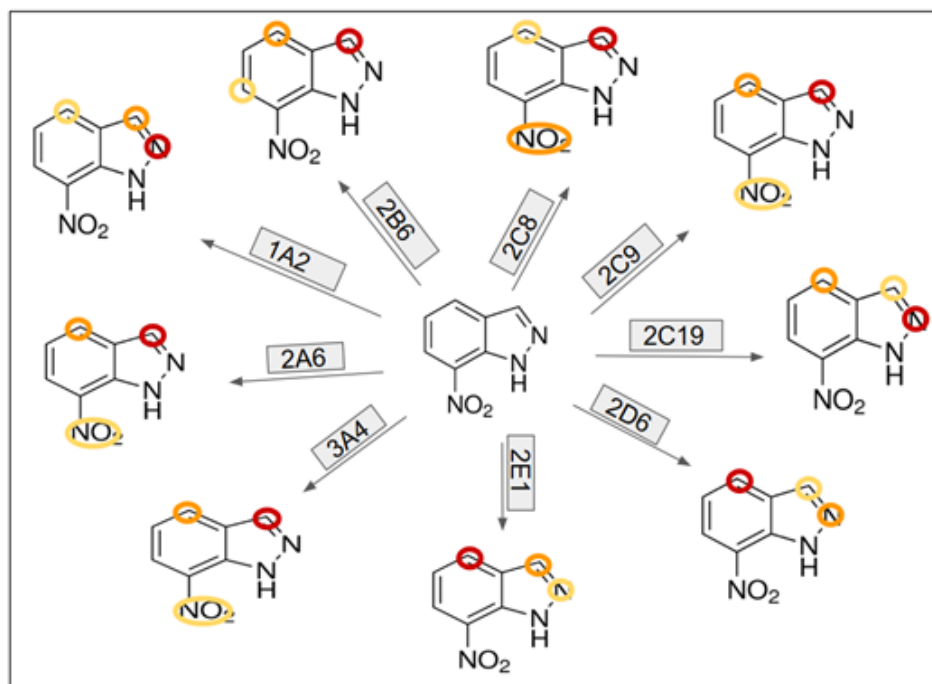


3A4 Ranking	Atom	3A4 Score	2D6 Ranking	Atom	2D6 Score	2C9 Ranking	Atom	2C9 Score
1	C.2	64.9	1	C.2	72.9	1	C.2	72.9
2	C.6	66.6	2	C.12	76.7	2	C.12	76.7
3	C.12	68.7	3	C.6	79.7	3	C.6	78.9

O Regioselectivity-Predictor (RS-WebPredictor) é um outro *software* disponível gratuitamente para a predição de SOMs. Uma grande diferença deste *software* é que, além das três isoformas comuns do complexo CYP450, utilizadas no SMARTCyp, também faz predição das isoformas menos comumente envolvidas no metabolismo: a 1A2, 2A6, 2B6, 2C19, 2C8 e 2E1. Neste modelo, os SoMs são representados como “metaboloforos”, um conceito que descreve a combinação de descritores de química quântica e topológicos para determinar a reatividade de potenciais sítios metabólicos (ZARETZKI *et al*, 2011).

Apesar de uma comparação direta ser equivocada, pois os *softwares* utilizam algoritmos diferentes, é interessante verificar que os SoMs selecionados pelo *software* Rs-WebPredictor foram semelhantes, como pode ser observado na Figura 4. O *software* hierarquiza os três átomos com maiores chances de serem metabolizados, mas diferentemente do SMARTCyp, não apresenta um *score* ao usuário. Além das diferenças existentes por conta do algoritmo, a presença de outras isoformas pelo Rs-WebPredictor levaram à obtenção de outros sítios de metabolização (SoMs), em relação à plataforma SMARTCyp. O grupo nitro (NO₂) ligado ao anel aromático foi tido como um SoM para as isoformas 2C8, 2C9, 3A4 e 2A6, enquanto um possível sítio de metabolismo no nitrogênio do anel imidazol foi apresentado para as isoformas 1A2, 2C19, 2D6 e 2E1.

Figura 4. Resultados obtidos pelo uso do software Rs-WebPredictor, ilustrando os átomos selecionados como possíveis sítios de metabolização do 7-NI. Na figura, a cor vermelha indica o sítio de maior chance de metabolização, a laranja o segundo, e a amarela o terceiro.



As ferramentas disponíveis para predição dos SoMs não fornecem informações quanto aos possíveis metabólitos formados, nem mesmo as reações prováveis de acontecerem. Mas, por se tratar de uma molécula pequena são simples de serem propostos. Por exemplo, dentre as reações básicas do metabolismo, o composto pode sofrer hidroxilação aromática. As posições mais prováveis, ao considerar a contribuição eletrônica dos grupos presentes e o seu impedimento estérico, seria o carbono que se encontra em posição "-para" ao grupo nitro e o carbono do anel de 5 membros, ambas selecionadas como SoMs pelos *softwares* utilizados (BARREIRO; FRAGA, 2015). Além disso, o grupo nitro também pode sofrer redução a amina e pode sofrer subsequente conjugação com ácido glicurônico e/ou sulfatação, caso as fases de metabolismo 2 ocorram sequencialmente. Ainda, os nitrogênios do anel de cinco membros estão aptos a sofrerem reações de conjugação e/ou sulfatação (BARREIRO; FRAGA, 2015). Entretanto, pode haver diferenças na reatividade do 7-NI frente às diferentes isoformas das CYP450 e mais de um metabólito pode ser formado. Ainda assim, em virtude de a CYP3A4 ser responsável por mais de 50% do metabolismo de fármacos existentes e ser a mais abundante, possui grandes probabilidades de agir sobre o 7-NI (DE GRAAF; VERMEULEN; FEENSTRA, 2005).

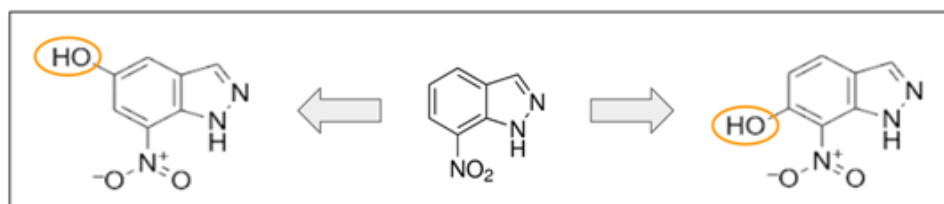
5.2 PREDIÇÃO DOS METABÓLITOS DO 7-NI

Os métodos para a predição da estrutura de metabólitos são comandados por abordagens baseadas em conhecimentos prévios, aos quais geralmente se valem de conhecimentos adquiridos por pesquisadores durante anos, por meio de observações e trabalhos experimentais. Neste trabalho, dois softwares foram empregados para predição dos prováveis metabólitos do 7-NI, o BioTransformer e MetaUltra e estes resultados serão apresentados e discutidos aqui.

O BioTransformer é uma ferramenta que permite a predição do metabolismo tanto em mamíferos, quanto da microbiota aquática e do solo. Este software emprega uma base de dados de conhecimentos já adquiridos e a abordagem “*machine learning*”, a qual é uma forma de inteligência artificial. A sua base de dados consiste em três grandes componentes: uma de biotransformações (MetXBioDB), contendo reações de metabolismo experimentalmente comprovadas; uma base de conhecimentos de regras de biotransformação e outras restrições envolvidas na predição de metabolismo; e algoritmos que envolvem ambas as partes genéricas e específicas para fazer a seleção e predição do metabolismo. O software consiste em cinco módulos independentes: EC-based (*Enzyme Commission-based*), CYP450, Fase II, microbiota intestinal humana e microbiota ambiental (DJOUMBOU-FEUNANG *et al.*, 2019).

A aplicação do BioTransformer para a predição dos prováveis metabólitos do 7-NI permitiu predizer dois metabólitos formados em reações de fase 1 (Figura 5). O *software* utilizou-se das isoformas 1A2, 2A6, 2C19, 2D6, 2E1; e 3A4 (seis das 7 isoformas responsáveis por mais de 90% do metabolismo de fármacos) e indicou que o 7-NI pode sofrer duas hidroxilações aromáticas nas posições *meta* e *orto* ao grupamento nitro. Correlacionando com a predição dos SoMs, somente o SMARTCyp previu a posição *orto* para as três isoformas 3A4, 2D6 e 2C9, enquanto o Rs-WebPredictor indicou tal sítio somente na isoforma 2B6, enquanto nenhum dos dois *softwares* indicaram a posição *meta* como possível SoM. O Biotransformer também não fornece quaisquer probabilidades calculadas sobre a formação dos metabólitos previstos.

Figura 5. Possíveis metabólitos do 7-NI formados a partir de reações de fase 1 obtidos pelo *software* Biotransformer.

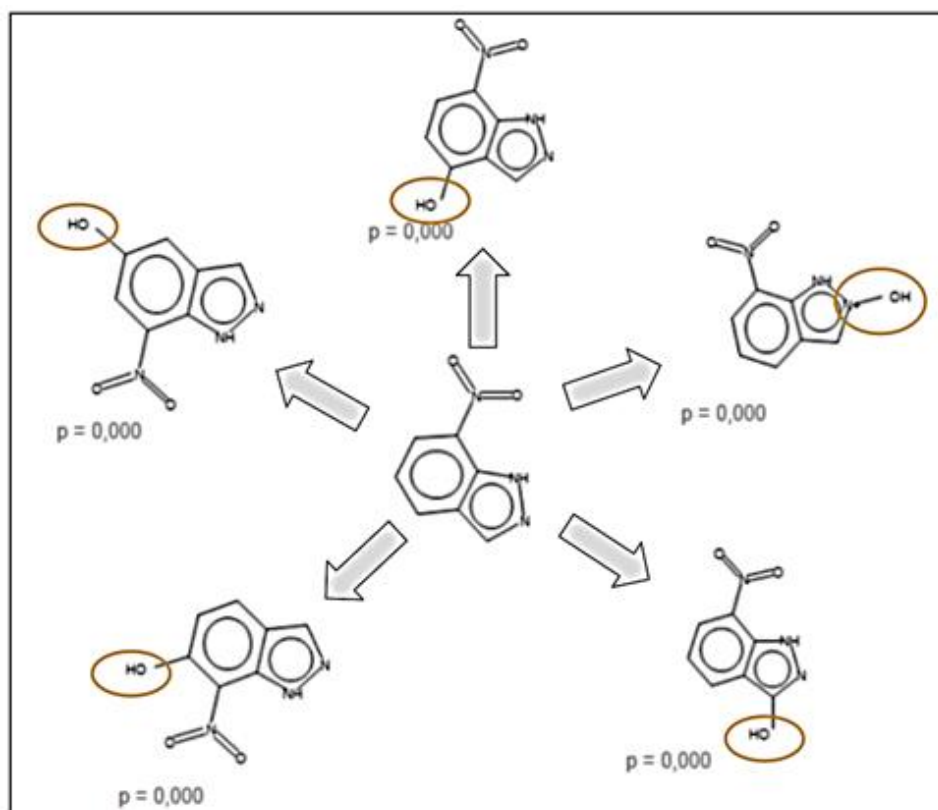


O MetaUltra é um *software* comercial para a predição de metabolismo que é capaz de prever dinamicamente o sítio de metabolismo e mostrar estruturas químicas no mesmo momento em que sofrem modificações feitas pelo usuário. O MetaUltra baseia-se em uma junção de base de dados com um modelo de predição QSAR para buscar potenciais metabólitos gerados. Além disso, também é capaz de prever a toxicidade (mutagenicidade e carcinogenicidade) e as propriedades físico-químicas dos metabólitos. O método QSAR é usado para identificar os SoMs e calcular a probabilidade dos átomos sofrem diferentes tipos de biotransformação, tanto na fase 1 quanto na fase 2 do metabolismo. O modelo QSAR foi construído a partir de testes para calcular o efeito estrutural na reatividade de diferentes átomos. Quanto a sua base de dados, é constituída de cerca de 15000 reações de metabolismo humano conhecidas, enzimas envolvidas, órgãos em que ocorrem, tipos de reações e rendimentos (PEACH, 2012; MULTICASE, 2017).

Para predição dos metabólitos do 7-NI, um *Threshold* de -10 foi empregado, aumentando as chances de ocorrência, contudo estes possuem menor probabilidade de acontecerem na prática. O *software* indica essa probabilidade com um valor de *p* para cada metabólito, sendo que $p = 1,000$ indica a maior possibilidade de a reação ocorrer de acordo com o *software*. Para facilitar a visualização, os resultados obtidos foram apresentados de acordo com as prováveis reações de metabolização: hidroxilação (Figura 6), epoxidação, N-oxidação e nitro-redução (Figura 7), glucuronidação (Figura 8), e metilação e acetilação (Figura 9).

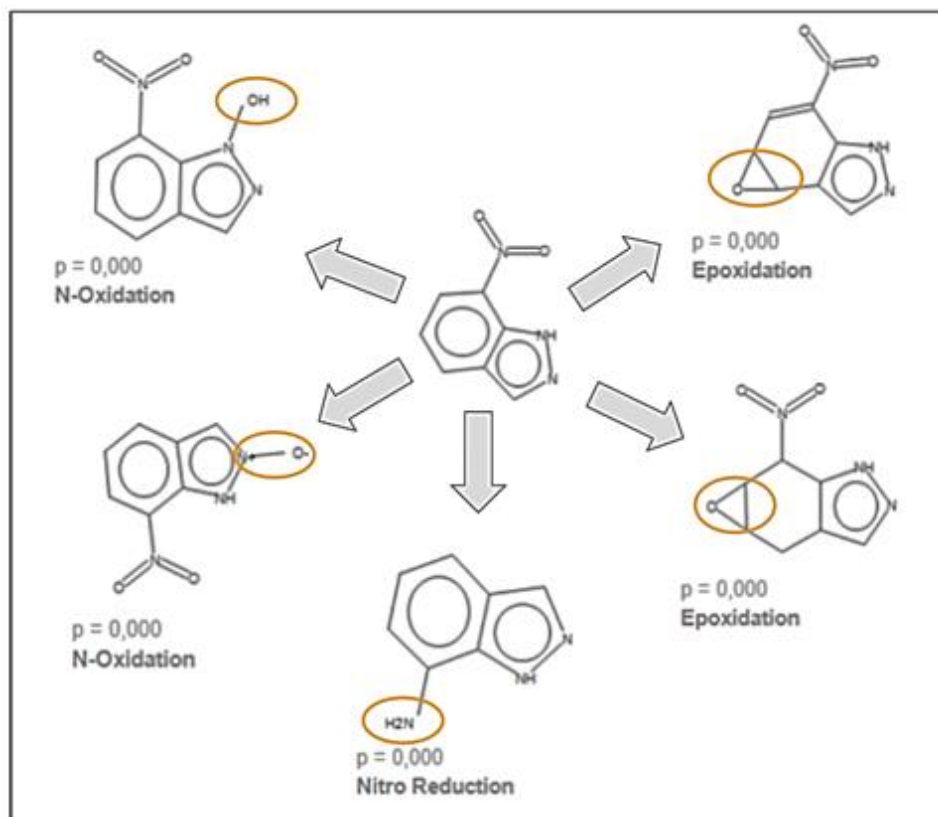
Dentre as cinco oxidações previstas pelo MetaUltra, duas foram indicadas também pelo *software* Biotransformer, enquanto as outras abrangem SoMs previstos tanto pelo *software* SMARTCyp, quanto pelo Rs-WebPredictor. Por exemplo, a hidroxilação na posição *para* ao grupamento nitro (NO₂) no anel aromático e a hidroxilação no nitrogênio do anel de cinco membros.

Figura 6. Resultados obtidos na determinação *in silico* dos prováveis metabólitos do 7-NI pelo *software* MetaUltra: reações de hidroxilação.



O *software* MetaUltra indicou uma N-oxidação no grupo NH do anel de cinco membros que não havia sido identificado como SoM em nenhuma das previsões realizadas usando o SMARTCyp e Rs-WebPredictor. Entretanto, o sítio de nitro-redução foi indicado Rs-WebPredictor (Figura 7).

Figura 7. Resultados obtidos na determinação *in silico* dos prováveis metabólitos do 7-NI pelo *software* MetaUltra: reações de N-oxidação, nitro redução e epoxidação.



Quanto às reações de fase 2, o emprego do *software* MetaUltra permitiu a predição das reações de glucuronidação (Figura 8), acetilação e metilação (Figura 9). Todas as conjugações foram propostas em um dos átomos de nitrogênio pertencentes ao anel de cinco membros. Apesar de as reações de fase 1 e 2 serem independentes e, portanto, o *software* utilizar a estrutura inicial para prever os metabólitos de fase 2, é comum que fase 1 seja precedente da segunda ao introduzir um grupo relativamente reativo para facilitar a conjugação. Sendo assim, é possível que as conjugações previstas ocorram após as reações redução ou oxidação citadas acima (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Figura 8. Resultados obtidos na determinação *in silico* dos prováveis metabólitos do 7-NI pelo *software* MetaUltra: reações de glucuronidação.

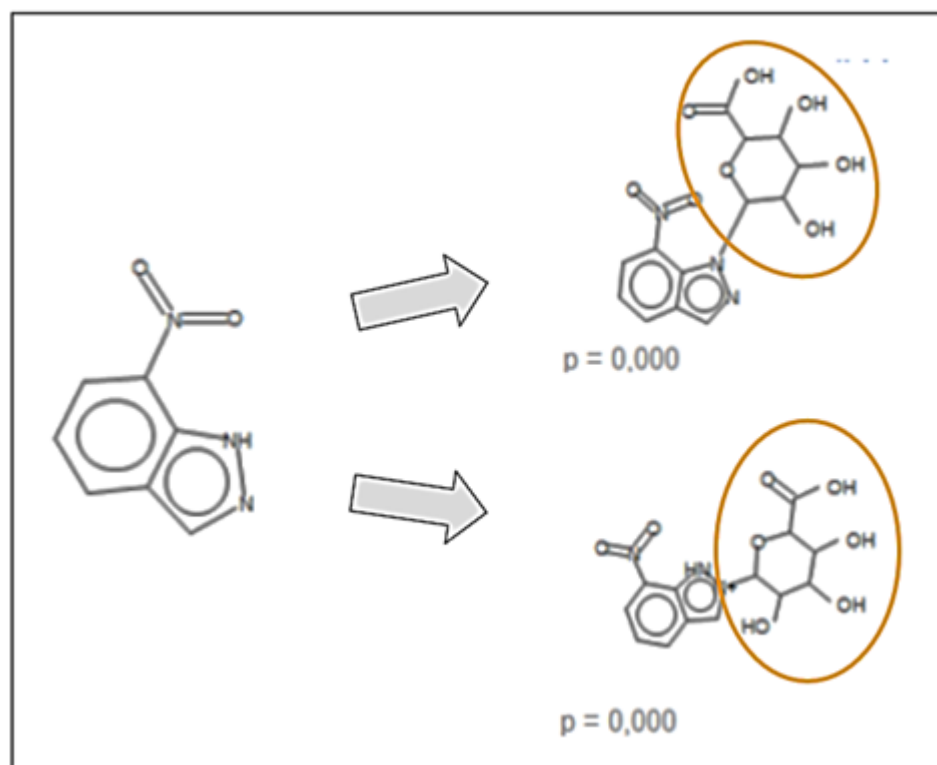
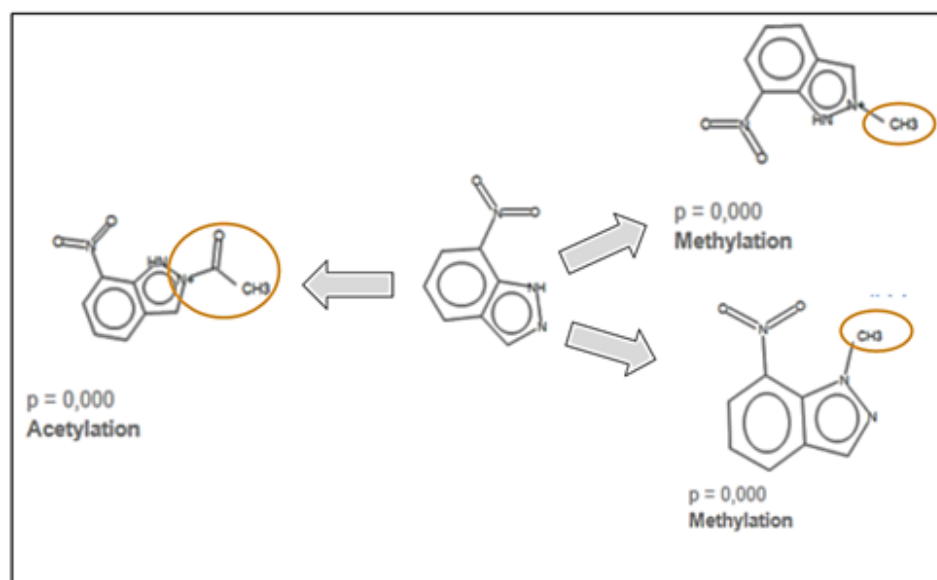


Figura 9. Resultados obtidos na determinação *in silico* dos prováveis metabólitos do 7-NI pelo *software* MetaUltra: reações de acetilação e metilação.



Como destacado anteriormente, a predição dos metabólitos do 7-NI pelo software MetaUltra só foi possível com a aplicação de um QSAR *Threshold* de -10, fornecendo, assim, um valor de $p = 0,000$ para os metabólitos, o que indica a baixa probabilidade de ocorrerem *in vivo*. Predições *in silico* anteriores indicaram que o 7-NI pode ser um potencial inibidor de algumas isoformas do complexo CYP450, como a 1A2, e não ser substrato para as isoformas 2C9, 2D6 e 3A4, corroborando com os dados encontrados pelo MetaUltra (DRUGBANK, 2020). Por outro lado, estes resultados não explicam os dados farmacocinéticos descritos para o 7-NI, referentes sobretudo ao curto tempo de meia vida e rápida ação (BUSH; POLLACK, 2000; NARDI *et al.*, 2014). Apesar disso, deve ser considerado o fato de que as metodologias *in silico* ainda não conseguem representar com precisão e exatidão o ocorrido *in vivo*. Ainda, é possível que haja a formação de mais de um metabólito e que suas concentrações variem entre si, pois pode haver diferenças na reatividade do 7-NI frente às isoformas da CYP450 e na velocidade das reações. No entanto, os resultados obtidos neste estudo *in silico* ainda podem ser utilizados para orientar a busca de metabólitos do 7-NI em estudos *in vitro* e *in vivo*, auxiliando a identificação dos mesmos por técnicas analíticas e espectroscópicas, como a cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de medicamentos é um processo demorado e custoso para a indústria farmacêutica. O entendimento do metabolismo de um fármaco é um obstáculo crucial a ser superado durante as fases iniciais da pesquisa. O uso de ferramentas *in silico* para avaliar propriedades farmacológicas, físico-químicas e farmacocinéticas podem oferecer perspectivas aos pesquisadores antes mesmo da aplicação de testes mais custosos e demorados.

O presente trabalho utilizou uma metodologia moderna para prever uma importante etapa da farmacocinética do 7-NI, o metabolismo. O emprego das ferramentas SMARTCyp e Rs-WebPredictor permitiu identificar os prováveis sítios de metabolismo deste candidato a fármaco. Os prováveis metabólitos puderam ser identificados pelo uso dos softwares BioTransformer e MetaUltra. Este último indicou valores p de 0,000 para todos os metabólitos previstos, sugerindo uma baixa probabilidade dos metabólitos ocorrerem *in vivo*. No entanto, apesar dos avanços das ferramentas *in silico*, estas podem ainda apresentar limitações, pois se baseiam no uso de algoritmos, que nem sempre fornecem dados suficientes que represente o que ocorre num ambiente biológico. Por outro lado, os resultados forneceram informações relevantes que irão nortear estudos farmacocinéticos e toxicológicos posteriores do 7-NI. Tais estudos permitirão compreender a rápida ação farmacológica deste fármaco, demonstrada em estudos prévios e auxiliarão na proposição de melhorias das suas propriedades terapêuticas, seja por meio de modificações de sua estrutura química, seja pelo uso de estratégias farmacotécnicas inovadoras.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. L.; LOPES, J. C. D.; OLIVEIRA, S. R.; DONNICI, C. L.; MONTANARI, C. A. Estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR) de bis-benzamidas com atividade antifúngica. **Quím. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1482- 1489, 2010.

ANDRADE, C. H.; SILVA, D. C.; BRAGA, R. C. *In silico* prediction of drug metabolism by P450. **Curr. Drug Metab.**, v. 15, n. 5, p. 514-525, 2014

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs – a review. **Appl. Biochem. Biotech.**, Clifton, v. 160, n. 6, p. 1699-1722, 2010.

ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocr. Metab. Immune**, v. 6, n. 2, p. 165-173, jun. 2006.

BARP, C. G. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão de 7-nitroindazol para a inibição da produção de óxido nítrico**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Farmacologia) - Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2016.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BASAK, S.C.; RESTREPO, G.; VILLAVECES, J.L. Advances in Mathematical Chemistry and Applications, volume 1. **Betham Science Publishers**: Amsterdam, 2015.

BERNDT, E. R.; GOTTSCHALK, A. H.; PHILIPSON, T. J.; STROBECK, M. W. Industry funding of the FDA: effects of PDUFA on approval times and withdrawal rates. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, n. 7, p. 545-554, 2005.

BUSH, M. A.; POLLACK, G. M. Pharmacokinetics and protein binding of the selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 21, p. 221–228, 2000.

CALIXTO, L. A. **Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos: aplicações em estudos de metabolismo in vitro**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CARRÃO, Daniel Blascke. **Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microssomas hepáticos**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, São Paulo, 2015.

CAVALHEIRO, A. H.; COMARELLA, L. Farmacocinética: modelos e conceitos – uma revisão de literatura. **R. Saude Desenvol.** v. 10, n. 5, 2016

COSTA, A.; SARMENTO, B.; SEABRA, V. An evaluation of the latest *in vitro* tools for drug metabolism studies. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 10, n. 1, p. 103-119, 2014

CHIN, C. M.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quím. Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

DE GRAAF, C.; VERMEULEN, N. P. E.; FEENSTRA, K. A. Cytochrome P450 *in silico*: an integrative modeling approach. **J. Med. Chem.**, v. 48, n. 8, p. 2725-2755, 2005.

DELANO, M. J.; WARD, P. A. The immune system's role in sepsis progression, and resolution, and long-term outcome. **Immunol. Rev.**, v. 274, p. 330-353, 2016.

DELINGER, R. P.; LEVY, M. M.; CARLET, J. M.; BION, J.; PARKER, M. M.; JAESCHKE, R.; REINHART, K.; ANGUS, D. C.; BRUN-BUISSON, C.; BEALE, R.; CALANDRA, T.; DHAINAUT, J. F.; GERLACH, H.; HARVEY, M.; MARINI, J. J.; MARSHALL, J.; RANIERI, M.; RAMSAY, G.; SEVRANSKY, J.; THOMPSON, B. T.; TOWNSEND, S.; VENDER, J. V.; ZIMMERMAN, J. L.; VICENT, J. L. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **J. Intensive Care Med.**, v. 39, p. 165–228, 2013

DJOUMBOU – FEUNANG, Y.; FIAMONCINI, J.; DE LA FUENTE, A. G.; MANACH, C.; GREINER, R.; WISHART, D. S. BioTransformer: A comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. **J. Cheminform.**, v. 11, n.2, 2019.

DUSSE, A. S. M. L.; VIEIRA, M. L.; CARVALHO, G. M.; Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med.**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 343-350, 2003.

DRUGBANK. 7-nitroindazole. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB02207>> Acessado em: 01/07/2020.

FLEISCHMANN, C.; SCHERAG, A.; ADHIKARI, N. K. J.; HARTOG, C. S.; TSAGANOS, T.; SCHLATTMAN, P.; ANGUS, D. C.; REINHART, K. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis: Current estimates and limitations. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 193, n. 3, p. 259-272, 2016.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur. Heart J.**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2011.

FRENCH, J. A.; GIDAL, B. E. Antiepileptic drug interactions. **Epilepsia.**, v. 41, p. 30 - 36, 2000.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN H. A.; ARMSTRONG E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOMBAR, J. K.; ALBERTS, J. J.; CASSIDY, K. C.; MATTIONI, B. E.; MOHUTSKY, M. A. *Silico* metabolism studies in drug discovery: Prediction of metabolic stability. **Curr. Comput-Aid. Drug.**, v. 2, p. 177-188, 2006.

GOTTI, S.; SICA, M.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; PANZICA, G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. **Microsc Res Tech.**, v. 68, p. 13-35, 2005.

GOVERS, R.; OESS, S. To NO or not to NO: 'where?' is the question. **Histol. Histopathol.**, v. 19, p. 585-605, 2004.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. EUA: **McGraw-Hill**, 2001.

HOTCHKISS, S. R.; MOLDAWER L. L.; OPAL, M. S.; REINHART, K.; TURNBULL, R. I.; VICENT, L. J. Sepsis and septic shock. **Nat. Ver. Dis Primers.**, 2016.

ILAS. Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. **Sepse: um problema de saúde pública**. Brasília, p. 90, 2015.

JACOBI, J. Pathophysiology of sepsis. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 59, p 3-8, 2002.

LIU, X.; JIA, L. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): Analytical Systemes and *In vivo* Studies. **Curr. Drug Metab.**, v. 8, n. 8, p. 815-882, 2007a

LIU, X.; JIA, L. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *In Vitro* Experiments. **Curr. Drug Metab.**, v. 8, p. 822-829, 2007b.

KAZMI, S. R.; JUN, R.; YU, M. S.; JUNG, C.; NA, D. In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. **Comput. Biol. Med.**, v. 109, p. 54-64, 2019

KLATT, P.; SCHMID, M.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; WERNER, E. R.; MAYER, B. The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. **J Biol Chem.**, v. 269, p.13861 - 13867, 1994;

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRATA, H.; MOILANEN, E.; Nitric oxide Production and signaling in inflammation. **Inflamm. Allergy Drug. Targets.**, v. 4, p. 471-479, 2005.

LANGOWSKI, J.; LONG, A. Computer systems for the prediction of xenobiotic metabolism **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 54, p. 407-415, 2002.

LEVI, M.; SCHULTZ, M., der POLL, T. Sepsis and thrombosis. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 39, p. 559-566, 2013.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 1997.

LOHNING, A. E.; LEVONIS, A.; NOONAN, S. W.; SCHWEIKER, S. S. A practical guide to molecular docking and homology modelling for medicinal chemists. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, n. 13, p. 1-18, 2017.

- MAJNO, G. The ancient riddle of σήψη (Sepsis). **J. Infect. Dis.**, p. 937-945, 1991.
- MARLETTA, A. M. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell Press.**, v. 78, p. 927-930, 1994.
- MARQUES, Lucas Maciel Mauriz. **Estudo de metabolismo in vitro do alcalóide Piplartina empregando microssomas hepático de ratos.** Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- MODA, Thiago Luiz. **Modelagem in silico de propriedades farmacocinéticas para a avaliação de candidatos a novos fármacos.** Tese (Doutorado em Física Aplicada) – Programa de Pós-graduação em Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Rev. Nutr.** Pontifícia Universidade Católica de Campinas, v. 15, n. 2, p. 223-238, 2002.
- MULTICASE INC. Multicase, 2017. MetaUltra (A simple yet powerful program for human metabolite prediction and toxicity screening). Disponível em: <http://www.multicase.com/meta-ultra#mu_features_database_support>. Acessado em: 01/07/2020.
- NARDI, G. M.; SCHESCHOWITSCH, K.; AMMAR, D.; OLIVEIRA, S. K.; ARRUDA, T. B.; ASSREUY, J. Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 42, p. 391-400, 2014.
- NATHAN, C. F.; HIBBS JR, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.**, 365-70, 1991.
- PEACH, M. L.; ZAKHAROV, A. V.; LIU, R.; PUGLIESE, A.; TAW, G.; WALQVISTA, A.; NICKLAUS, M. C. Computational tools and resources for metabolism-related property predictions. 1. Overview of publicly available (free and commercial) databases and software. **Future Med. Chem.**, v. 4, n. 15, p. 1907-1932, 2012.
- PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quím. Nova**, v. 30, n. 1, p. 171 - 177, 2007.
- PIECHOTA, P.; CRONIN, M.; HEWITT, M.; MADDEN J. Pragmatic approaches to using computational methods to predict xenobiotic metabolism. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 53, p. 1282-1293, 2013.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.
- RHEE, C.; DANTES, R.; EPSTEIN, L.; MURPHY, D. J.; SEYMOUR, C. W.; IWASHYNA, T. J.; KADRI, S. S.; ANGUS, D. C.; DANNER, R. L.; FIORE, A. E.; JENIRGAN, A. J.; MARTIN, G. S.; SEPTIMUS, E.; WARREN, D. K.; KARCOZ, A.; CHAN, C.; MENCHACA, J. T.; WANG,

R.; GRUBER, S.; KLOMPAS, M. Incidence and trends of Sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, **JAMA**. v. 318, p. 1241–1249, 2017.

RUDIK, A; DMITRIEV, A.; LAGUNIN, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. SOMP: web server for *in silico* prediction of sites of metabolism for drug-like compounds, **J. Bioinform.**, v. 31, p. 2046-2048, 2015.

RYDBERG, P.; et al. SMARTCyp: A 2D method for prediction of cytochrome P450-mediated drug metabolism. **ACS Med. Chem. Lett.**, v. 1, n. 3, p. 96-100, 2010.

MERCK. Sigma-Aldrich, (2020). 7-Nitroindazole. Disponível em:
< <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n7778?lang=pt®ion=BR>> Acessado em: 08/08/19.

SEBBEN, V. C.; LUGOCH, R. W.; SCHLINKER, C. S.; ARBO, M. D.; VIANNA, R. L. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para a quantificação sérica de paracetamol. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Porto Alegre-RS. v. 46, n. 2, p. 143-148, 2010.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SINGER, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **J. Am. Med. Assoc.**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SMITH, D. A.; VAN DE WATERBEEMD, H.; WALKER, D. K. Pharmacokinetics and metabolism in drug design. Germany: **Wiley-VCH**, 2001.

STORPITIS, S.; GAI, M. N.; DE CAMPOS, R.; GONÇALVES, J. E. Farmacocinética: Conceitos, Definições e Relação com a Farmacodinâmica e a Biofarmácia (Biofarmacotécnica). In: _____ (Org.). **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p. 3-16.

TARCSAY, Á. KESERU, G. M. In silico site of metabolism prediction of cytochrome P450-mediated biotransformations. **Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.**, v. 7, n. 3, p. 299-312, 2001.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics: the quantitative basis of drug therapy. **Medicine (LWW)**. 2006.

TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim. Biophys. Acta.**, p 437-455, 1999.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003

VAVOUGIOS, George D. et al. Novel candidate genes of the PARK7 interactome as mediators of apoptosis and acetylation in multiple sclerosis: an *in silico* analysis. **Mult. Scler. Relat. Dis.**, 2017.

WEN, H.; JUNG, H.; LI, X. Drug Delivery Approaches in addressing clinical pharmacology-related issues: opportunities and challenges. **AAPS J.**, v. 17, n. 6, p. 1327-1340, 2015

WILLIAMS, A. D.; LEMKE, T. L. Foye's principles of medicinal chemistry. 5th ed. EUA: **Medicine (LWW)**, 2002.

WINTER, M. E. Basic Clinical Pharmacokinetics. 5.ed. **Medicine (Baltimore)**., p. 560, 2009.

ZARETZKI, J.; BERGERON, C.; RYDBERG, P.; HUANG, T.; BENNETT, K.; BRENEMAN, C. RS-Predictor: a new tool for predicting sites of cytochrome P450-mediated metabolism applied to CYP 3A4. **J. Chem. Inf. Model.** v. 51, p. 1667-1669, 2011.