



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

GUILHERME EDUARDO MARTINS MENDES

**TRIAGEM VIRTUAL PARA A DESCOBERTA DE NOVOS
INIBIDORES DO RECEPTOR P2X7 E PLANEJAMENTO DE
POTENCIAIS COCRISTAIS DOS LIGANTES BIOATIVOS**

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal Fluminense visando a
obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia.

Orientador: Murilo Lamim Bello

Coorientador: Robson Xavier Faria



Niterói
2025

GUILHERME EDUARDO MARTINS MENDES

**TRIAGEM VIRTUAL PARA A DESCOBERTA DE NOVOS INIBIDORES DO
RECEPTOR P2X7 E PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS DOS
LIGANTES BIOATIVOS**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Planejamento Farmacêutico e Simulação Computacional - LaPFarSC do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Farmácia/UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPERJ, UFF-FOPESQ.

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade Federal
Fluminense como requisito parcial
visando a obtenção do grau de
Mestre em Ciências e Biotecnologia

Orientador: Murilo Lamim Bello

Coorientador: Robson Xavier Faria

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

M538t Mendes, Guilherme Eduardo Martins
Triagem virtual para a descoberta de novos inibidores do receptor P2X7 e planejamento de potenciais cocristais dos ligantes bioativos / Guilherme Eduardo Martins Mendes. - 2025. 106 f.: il.

Orientador: Murilo Lamim Bello.
Coorientador: Robson Xavier Faria.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, 2025.

1. Receptor P2X7. 2. Química Computacional. 3. Planejamento de Fármacos. 4. Planejamento de Estrutura Cristalina. 5. Produção intelectual. I. Bello, Murilo Lamim, orientador. II. Faria, Robson Xavier, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

GUILHERME EDUARDO MARTINS MENDES

TRIAGEM VIRTUAL PARA A DESCOBERTA DE NOVOS INIBIDORES DO RECEPTOR P2X7 E PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS DOS LIGANTES BIOATIVOS

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade Federal
Fluminense como requisito parcial
visando a obtenção do grau de
Mestre em Ciências e Biotecnologia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Murilo Lamim Bello – PPBI – UFRJ (Orientador/Presidente)

Prof. Dr. André Lopes Fully – PPBI – UFF

Profa. Dra. Bianca Aloise Maneira Corrêa Santos – PharmaScia - Santos/SP

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha – CDTS – FIOCRUZ

Prof. Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista – PPBI – UFF

Prof. Dr. Robson Xavier Faria – PPBI – FIOCRUZ (Coorientador)

Dedico esse trabalho ao meu avô que, muito antes da minha graduação, foi o grande motivador da minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à minha mãe, ao meu pai e meus irmãos pelo apoio às minhas decisões em cada etapa.

À confiança de muitos amigos que estão presentes na minha trajetória acadêmica.

Agradeço a todos(as) colegas da pós-graduação e a todos(as) colegas do laboratório (LaPFarSC), adquiri muitos aprendizados ao longo dos projetos desenvolvidos em conjunto.

Agradeço também a todos professores e professoras pelos ensinamentos, principalmente aos meus orientadores pelas oportunidades.

Por fim, um agradecimento às agências de fomento, CAPES e FAPERJ, e às instituições, UFRJ e UFF onde pude me desenvolver nessa etapa. Obrigado ao programa de pós-graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS	XII
LISTA DE QUADRO E TABELAS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 INFLAMAÇÃO CRÔNICA E O RECEPTOR P2X7	1
1.2 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS	3
1.3 SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL	5
1.3.1 MODELAGEM MOLECULAR	5
1.3.2 TRIAGEM VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR	7
1.3.3 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR	9
1.3.4 LIGANTES BIOATIVOS	10
1.4 PLANEJAMENTO FARMACÊUTICO	11
1.4.1 TECNOLOGIA INDUSTRIAL FARMACÊUTICA	11
1.4.2 ESTRUTURAS CRISTALINAS DOS FÁRMACOS	13
1.4.3 COCRISTAIS DE FÁRMACOS	15
1.4.4 PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS	17
1.5 JUSTIFICATIVA	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 DESCOBERTA DE FÁRMACO	25
3.1.1 MODELAGEM MOLECULAR DE LIGANTE E RECEPTOR	25
3.1.2 TRIAGEM VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR	25
3.1.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	26

3.1.4 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR	27
3.2 PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS	29
3.2.1 BIBLIOTECA DE COFORMADORES	29
3.2.2 TRIAGEM VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR	30
3.2.3 CÁLCULOS DE PROPORÇÃO E SIMETRIA	31
3.2.4 CÁLCULOS DE ESTABILIDADE DA CÉLULA CRISTALINA	32
4 RESULTADOS	34
4.1 DESCOBERTA DE NOVOS INIBIDORES DE P2X7R	34
4.1.1 MODELAGEM MOLECULAR DOS LIGANTES E RECEPTOR	34
4.1.2 TRIAGEM VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR	35
4.1.3 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR	39
4.2 PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS	44
4.2.1 TRIAGEM DE COMPLEMENTARIDADE	44
4.2.2 DOCKING MOLECULAR DE FÁRMACO E COFORMADOR	49
4.2.3 COMPLEXOS ELEGÍVEIS PARA CÁLCULOS AVANÇADOS	54
4.2.4 CÁLCULOS DE PROPORÇÃO E SIMETRIA	56
4.2.5 CÁLCULOS DE ESTABILIDADE DA CÉLULA CRISTALINA	59
5 DISCUSSÃO	62
5.1 DESCOBERTA DE NOVOS INIBIDORES	62
5.2 PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS	64
5.2.1 POTENCIAIS COCRISTAIS DE LIGANTES BIOATIVOS	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
6.1 CONCLUSÃO	68
6.2 PERSPECTIVAS	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8 APÊNDICES E ANEXOS	88
8.1 APÊNDICES	88
8.1.1 ARTIGOS PUBLICADOS	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A740003	Substância inibidora com alta afinidade pelo receptor P2X7
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ATP	Adenosina Trifosfato
CADD	Planejamento de fármacos com auxílio do computador (em inglês, <i>Computer-Aided Drug Design</i>)
CCDC	Centro de Dados Cristalográficos da Universidade de Cambridge (em inglês, <i>The Cambridge Crystallographic Data Centre</i>)
CIF	Arquivo de Informações Cristalográficas (em inglês, <i>Crystallographic Information File</i>)
CSD	Banco de dados de estruturas da Universidade de Cambridge (em inglês, <i>Cambridge Structural Database</i>)
CSP	Previsão da estrutura cristalina (em inglês, <i>Crystal Structure Prediction</i>)
DM	Dinâmica Molecular
DFT	Teoria do funcional da densidade (em inglês, <i>Density Functional Theory</i>)
DoE	<i>Design of Experiments</i>
DRX	Difração de raios X
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (em inglês, <i>Generally Recognized As Safe</i>)
GVHD	Doença do enxerto contra o hospedeiro (em inglês, <i>Graft-versus-host disease</i>)
HF	Hartree-Fock

HTVS	Triagem virtual de alto desempenho (em inglês, <i>High-Throughput Virtual Screening</i>)
IC50	Concentração inibitória em 50%
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
LBDD	Planejamento de fármaco baseado no ligante (em inglês, <i>Ligand-Based Drug Design</i>)
MMFF94	Campo de Força Molecular Merck (em inglês, <i>Merck Molecular Force Field</i>)
MOPAC	<i>Molecular Orbital PACkage</i>
MVD	<i>Molegro Virtual Docker</i>
NLRP3	Gene do receptor NOD-like tipo 3
NPT	Simulação de dinâmica molecular baseada em número constante (N), pressão constante (P) e temperatura constante (T)
NVT	Simulação de dinâmica molecular baseada em número constante (N), volume constante (V) e temperatura constante (T)
P2X7	Canal inotrópico 7 da família dos receptores purinérgicos P2X
P2X7R	Receptor P2X7
PDB	Banco de dados de proteínas (em inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
PM7	Parâmetros de otimização geométrica para métodos semi-empíricos
QSAR	Relação quantitativa entre estrutura e atividade (em inglês, <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio quadrático médio das posições atômicas (em inglês, <i>Root Mean Square Deviation</i>)
RMSF	Flutuação quadrática média da estrutura (em inglês, <i>Root Mean Square Fluctuation</i>)

SBDD	Planejamento de fármaco baseado na estrutura (em inglês, <i>Structure-Based Drug Design</i>)
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SCF	Campo autoconsistente (em inglês, <i>Self-Consistent Field</i>)
TGI	Trato Gastrointestinal
TIF	Tecnologia Industrial Farmacêutica

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

	Página
Figura 1. Ilustração representativa do P2X7R e sua atuação como canal de cátions quando ligado por ATP em situação normal ou acima do normal. _____	2
Figura 2. Três abordagens utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos: (1) mapeamento das ciências ômicas, (2) mapeamento do universo químico e (3) planejamento de testes clínicos. _____	4
Figura 3. Representação do P2X7R através da modelagem molecular. (A) Mapeamento das regiões de folhas beta e alfa hélices em analogia à anatomia do golfinho. (B) Três subunidades homólogas formam o canal. (C) Visão lateral, destacada em B, com a cavidade de ligação do ATP. (D) Visão superior, destacando as três cavidades de ligação de ATP e as três cavidades de fármacos. _____	7
Figura 4. P2X7R inserido na bicamada lipídica representando a membrana plasmática, sem as moléculas de água e os íons para facilitar a visualização. _____	10
Figura 5. Tipos de estruturas cristalinas. _____	14
Figura 6. Fármacos classificados como classe II e IV na etapa de aguardando aprovação em comparação aos fármacos já aprovados no mercado no início do século XXI _____	15
Figura 7. Fluxograma de execução do projeto dividido em duas principais etapas, a primeira vinculada à descoberta de fármacos e a segunda etapa de planejamento de potenciais cocrystalis. _____	24

- Figura 8.** Estrutura do P2X7R com partes azul indicando a qualidade do modelo, gráfico de Ramachandran demonstrando a estereoquímica dos aminoácidos em regiões favoráveis e os resultados de estimativa de qualidade indicando as regiões de interesse como viáveis para análise. _____ 34
- Figura 9.** Estruturas químicas dos ligantes selecionados por triagem virtual. As substâncias são narirutina, diosmina, complanatusida, hesperidina, oroxina B, itacitinibe, ácido litospermico, lifitegrast, LDC1267 e velpatasvir. _____ 35
- Figura 10.** Resultados do docking molecular indicando a posição e interações com resíduos do P2X7R. As moléculas são (A) velpatasvir (amarelo), (B) ácido litospermico (roxo) e (C) narirutina (laranja). As letras após o nome do aminoácido representam as subunidades homoméricas do P2X7, sendo, A em verde, B em ciano e C em magenta. _____ 33
- Figura 11.** Os ligantes selecionados inibiram a captação de corante induzida por BzATP em macrófagos peritoneais de camundongos. Esses experimentos foram realizados por colaboradores do LAPSA/IOC/Fiocruz. _____ 38
- Figura 12.** Sistema contendo um ligante e P2X7R inserido na bicamada fosfolipídica para DM, sem as moléculas de água e íons para visualização do sistema _____ 40
- Figura 13.** Análise da trajetória dinâmica molecular de P2X7 ligado aos seus respectivos ligantes. (A) RMSF do receptor completo, (B) RMSD dos ligantes, (C) RMSD da proteína. _____ 41
- Figura 14.** Pose final do velpatasvir após 100 ns de trajetória. _____ 42

Figura 15. Pose final do itacitinibe após 100 ns de trajetória. _____	43
Figura 16. Pose final da narirutina após 100 ns de trajetória. _____	43
Figura 17. Pose final do ácido litospermico após 100 ns de trajetória. ____	43
Figura 18. O sítio de ligação dos quatro ligantes promissores (velpatasvir, itacitinibe, ácido litospermico e narirutina) no P2X7R. Alvo molecular em (A) vista superior e (B) vista lateral. _____	44
Figura 19. Representação conformacional de 27 dos 107 coformadores após otimização geométrica. _____	45
Figura 20. Complexos favoráveis do velpatasvir com os dois produtos naturais, ácido litospermico e narirutina. _____	55
Figura 21. Complexo favorável do itacitinibe com o ácido lactobiônico. _	55
Figura 22. Estruturas 1 a 5 selecionadas de velpatasvir (amarelo) e ácido litospermico (rosa). _____	57
Figura 23. Estruturas 6 a 10 selecionadas de velpatasvir (amarelo) e ácido litospermico (rosa). _____	58
Figura 24. Cálculos realizados para a célula unitária hipotética VL2. ____	59
Figura 25. Modificação dos ângulos dos três eixos cálculos de alta pressão da estrutura VL2. _____	60
Figura 26. Simetria fixa dos ângulos dos três eixos cálculos de alta pressão da estrutura VL1. _____	61

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Tabela 1. Sistema de Classificação Biofarmacêutica. _____	12
Tabela 2. Exemplos de modulação das propriedades físico-químicas de IFAs por meio de cocristais. _____	17
Tabela 3. Parâmetros utilizados para definição da bicamada lipídica da membrana celular. _____	27
Tabela 4. Biblioteca de 107 coformadores utilizadas para triagem de cocristais. _____	30
Tabela 5. 10 ligantes selecionados a partir da triagem virtual e docking molecular, A740003 e ATP adicionados para comparação de pontuação. _____	36
Tabela 6. Atividade inibitória dos ligantes testados in vitro no P2X7R de camundongo. _____	39
Tabela 7. Cálculo de energia livre de ligação dos ligantes mais promissores realizado durante os últimos 5 ns da trajetória de DM através do método MM-PBSA. _____	42
Tabela 8. Resultado da análise qualitativa (Hit Rate %) dos coformadores com o velpatasvir que obtiveram taxa de acerto maior que zero. _____	45
Tabela 9. Resultado da análise qualitativa (Hit Rate %) dos coformadores com o itacitinibe que obtiveram taxa de acerto maior que zero. _____	46

Tabela 10. Resultado da análise qualitativa (Hit Rate %) dos coformadores com o narirutina que obtiveram taxa de acerto maior que zero. _____	47
Tabela 11. Resultado da análise qualitativa (Hit Rate %) dos coformadores com o ácido litospermico que obtiveram taxa de acerto maior que zero. _____	48
Tabela 12. Análise qualitativa (<i>Hit Rate</i> %) entre as moléculas bioativas selecionadas. _____	48
Tabela 13. <i>Ranking</i> de energias de interação dos 15 primeiros complexos do velpatasvir, (*) também foi avaliada a energia de interação da própria molécula como sendo um coformador. _____	50
Tabela 14. <i>Ranking</i> de energias de interação dos 15 primeiros complexos do itacitinibe, (*) também foi avaliada a energia de interação da própria molécula como sendo um coformador. _____	51
Tabela 15. <i>Ranking</i> de energias de interação dos 15 primeiros complexos do narirutina, (*) também foi avaliada a energia de interação da própria molécula como sendo um coformador. _____	52
Tabela 16. <i>Ranking</i> de energias de interação dos 15 primeiros complexos do ácido litospermico, (*) também foi avaliada a energia de interação da própria molécula como sendo um coformador. _____	53
Tabela 17. <i>Ranking</i> resumido dos complexos para cada um dos candidatos a formação de cocrystal. _____	54
Tabela 18. Sistemas cristalinos estáveis para velpatasvir (VEL) e ácido litospermico (LIT). _____	56

RESUMO

As doenças inflamatórias são oriundas de múltiplos processos biológicos que envolvem as células do sistema imunológico. As células imunomodulatórias apresentam alta expressão e abundância do canal iônico de membrana P2X7, tornando-o um alvo promissor para o tratamento. Nas últimas décadas, apesar dos avanços de novos medicamentos anti-inflamatórios, a busca por novas moléculas seguras e eficazes tem-se intensificado devido às falhas nos tratamentos existentes em decorrência dos efeitos colaterais graves e interações medicamentosas. Nesse sentido, a descoberta de novas substâncias capazes de inibir a ação do receptor P2X7 (P2X7R) envolvem as etapas de triagem virtual de milhares de moléculas químicas em ensaios *in silico* e posterior validação de afinidade em ensaios *in vitro*. Além da identificação de potenciais candidatos a fármaco, o estudo propõe-se indicar as estruturas cristalinas mais estáveis para desenvolvimento de formulações farmacêuticas. Utilizando o entendimento físico-químico das moléculas candidatas é possível encontrar possíveis associações com outras moléculas de interesse para formação de cocrystalos hipotéticos a fim de fornecer dados para um produto final com perfil terapêutico aprimorado. Portanto, o objetivo do projeto consiste em realizar a triagem virtual de 2.774 moléculas no P2X7R, identificar a diversidade de classes de fármacos e novas moléculas candidatas e planejar estruturas cristalinas de cocrystalos, visando indicar as moléculas mais promissoras tanto no âmbito da química medicinal quanto na tecnologia industrial farmacêutica. Métodos de modelagem molecular e química computacional foram utilizados, através dos programas Avogadro, MOPAC2016, PyMOL e Mercury, assim como Molegro Virtual Docker, USPEX e Quantum Espresso para planejamento farmacêutico e mapeamento das estruturas cristalinas. Como resultado, substâncias de classes distintas apresentaram ação inibitória, como antivirais e flavonoides. Quatro substâncias destacaram-se pela alta afinidade no P2X7R, sendo dois fármacos, veltapavir (VEL) e itacitinibe, e dois produtos naturais, narirutina e ácido litospermico (LIT). Na etapa de planejamento farmacêutico, o VEL destacou-se associado ao LIT e vice-versa, por esse motivo foram investigadas suas estruturas cristalinas. As potencialmente estáveis encontram-se na proporção de 1:1 (VEL:LIT) e com a tendência em formar sistema cristalino triclinico. As informações cristalinas poderão ser utilizadas de forma racional para a recristalização e estudos de taxa de dissolução, fornecendo estratégias para novas patentes e processos farmacêuticos.

Palavras-chave: Receptor P2X7, Química Computacional, Planejamento Farmacêutico, Planejamento de Estrutura Cristalina.

ABSTRACT

Inflammatory diseases emerge from multiple biological processes involving immune cells. Immunomodulatory cells have high expression and abundance of the membrane ion channel P2X7, making it a promising target for treatment. Despite recent advances in anti-inflammatory medications, treatment limitations due to severe side effects and drug interactions have intensified the search for safer and more effective compounds. In this context, discovering new P2X7 receptor (P2X7R) inhibitors involves virtual screening of thousands of molecules through *in silico* assays, followed by affinity validation *in vitro*. This study aims to both identify potential drug candidates and determine the most stable crystal structures for pharmaceutical formulation development. Through physicochemical analysis of candidate molecules, we explored potential associations with other molecules of interest for hypothetical co-crystal formation, seeking to develop products with enhanced therapeutic profiles. Therefore, the project's objective is to conduct virtual screening of 2,774 molecules against P2X7R, identify drug class diversity and new candidate molecules, and design crystalline cocrystal structures, aiming to indicate the most promising molecules in both medicinal chemistry and pharmaceutical industrial technology contexts. Molecular modeling and computational chemistry methods were employed using Avogadro, MOPAC2016, PyMOL, and Mercury software, as well as Molegro Virtual Docker, USPEX, and Quantum Espresso for pharmaceutical planning and crystal structure mapping. Results showed that substances from distinct classes may have inhibitory action, such as antivirals and flavonoids. Four candidate molecules demonstrated high binding affinity with P2X7R: two drugs, veltapasvir (VEL) and itacitinib, and two natural products, narirutin and lithospermic acid (LIT). In pharmaceutical formulation design, VEL and LIT demonstrated mutual molecular compatibility. The potentially stable structures were found in a 1:1 ratio (VEL:LIT) with a tendency to form triclinic crystal systems. The crystal structure data can be rationally applied to recrystallization and dissolution rate studies, providing valuable strategies for new patents and pharmaceutical processes.

Keywords: P2X7 receptor, Computational Chemistry, Pharmaceutical Design, Crystalline Structure Design.

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO CRÔNICA E O RECEPTOR P2X7

A comunicação celular em organismos multicelulares complexos, como em mamíferos superiores, é orquestrada por moléculas sinalizadoras que participam das funções biológicas para regulação do sistema imune adaptativo e inato. Conhecidas como citocinas, essas moléculas são dispersas em espaços extracelulares principalmente na presença de substâncias antigênicas. O sistema imunológico, por sua vez, retroalimenta a eficiência dessa comunicação mobilizando todas as suas células que possuem receptores membranares, principalmente linfócitos e macrófagos. Dessa forma, as respostas imunológicas desencadeadas por antígenos desempenham um papel fundamental para a sinalização inflamatória (DI VIRGILIO *et al.*, 2017; JIN *et al.*, 2024).

Na década de 1970, foram mapeadas como sinalizadores extracelular as moléculas de bases nitrogenadas. As purinas e pirimidinas tornaram-se importantes no entendimento do mecanismo inflamatório. Desde então, a caracterização dos receptores dessas moléculas ganharam atenção, como os receptores seletivos por adenosina trifosfato (ATP). Entre as diversas evidências, observou-se uma alta concentração de ATP (centenas de micromolar) no interstício celular em locais de inflamação em comparação a um tecido saudável, no qual a presença de ATP encontrava-se na faixa de nanomolar, ou seja, baixa. Assim, intensificaram-se os estudos dos canais de membrana celular modulados por moléculas purinérgicas e seus papéis nos processos inflamatórios. Atualmente, entende-se como uma patofisiologia a alta concentração de ATP em determinados tecidos (HATTORI; GOUAUX, 2012; DI VIRGILIO *et al.*, 2017).

Esses receptores de membrana, em especial os seletivos por ATP, são formados por uma família de sete membros, conhecidos como canais ionotrópicos do P2X1 ao P2X7, que têm como característica a abertura de um poro cátion-seletivo ativado pelo ATP. Os P2Xs têm sido associados a uma série de distúrbios, incluindo hipertensão (JI *et al.*, 2012), tosse crônica (MAGALHÃES, 2020), inflamatórios e imunológicos (BURNSTOCK, 2016), dor (TSUDA, 2017) e

aterosclerose (FERRARI, 2015). Esses canais estão presentes em células de diversos tecidos animais, e principalmente apresentam alta expressão em células inflamatórias e imunomoduladoras, incluindo microglia, macrófagos, linfócitos e células dendríticas, que são capazes de mediar vários processos relevantes, como liberação de citocinas, geração de óxido nítrico, morte de patógenos intracelulares, citotoxicidade (BARALDI *et al.*, 2003; HABERMACHER *et al.*, 2015).

Entre os sete membros, o receptor P2X7 (P2X7R) apresenta uma característica única quando exposto de forma prolongada ao ATP, na qual o poro do canal faz uma abertura acima do normal na membrana plasmática. Essa abertura pode levar ao rápido influxo de cátions e moléculas hidrofílicas com massa molecular de até 900 Da, como peptídeos, agravando a condição inflamatória (Figura 1) (DRILL *et al.*, 2021). Antes de ser o sétimo membro da família P2X, o receptor se chamava P2Z, um membro órfão, devido às suas características exclusivas, porém a partir da sua elucidação molecular verificou-se como o último integrante da família P2X (DI VIRGILIO, 1995; KARASAWA; KAWATE, 2016). No entanto, o que faz o P2X7R ser um alvo emergente contra a inflamação é sua influência direta, quando ativado, no processamento intracelular da citocina pró-inflamatória interleucina-1 (IL-1) em monócitos, macrófagos e células microgliais, que subsequentemente produzem proteínas formadoras de inflamassoma (FRIEDLE *et al.*, 2010; DI VIRGILIO *et al.*, 2017).

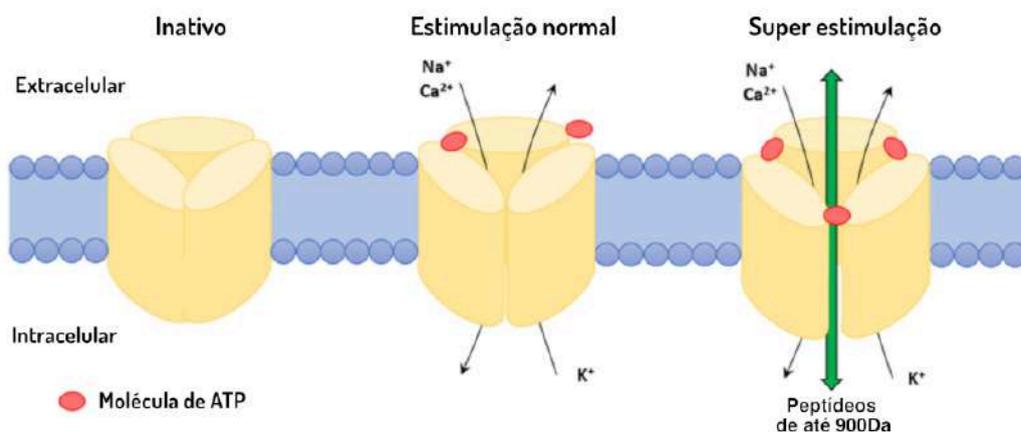


Figura 1. Ilustração representativa do P2X7R e sua atuação como canal de cátions quando ligado por ATP em situação normal ou acima do normal (Adaptado de DRILL *et al.*, 2021).

Por conseguinte, as alterações imunológicas prolongadas e persistentes são fatores que contribuem para a inflamação crônica, em que mediadores químicos no local da inflamação promovem a constante destruição tecidual e as múltiplas tentativas de substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, causando doenças graves (SOLIMAN; BARREDA, 2022). As doenças oriundas desses processos incluem diversos tipos de câncer e complicações cardiovasculares, que representam riscos significativos para a saúde humana e mortalidade (VAZQUEZ-GARZA *et al.*, 2017; MISHRA *et al.*, 2024). Apesar dos avanços de novos medicamentos anti-inflamatórios e a busca por novas moléculas seguras e eficazes, os tratamentos existentes ainda possuem falhas em decorrência de efeitos colaterais e interações medicamentosas graves que, paralelamente, contribuem para sobrecarga financeira nos sistemas de saúde ao redor do mundo (PERCHA; ALTMAN, 2013; TSAO *et al.*, 2023; YU *et al.*, 2023).

Portanto, devido à relevante atuação do P2X7R na patofisiologia da inflamação, a busca avançada por novas moléculas capazes de inibir sua ação poderia auxiliar, a longo prazo, na melhoria da qualidade de vida de pacientes em tratamento de doenças inflamatórias e imunossupressoras (BHATTACHARYA; BIBER, 2016).

1.2 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

Na área farmacêutica, o desenvolvimento de um novo medicamento é um longo processo que envolve várias áreas de conhecimento e estágios antes da aprovação regulatória. Desde a concepção de alvos moleculares biológicos até a descoberta de um potencial fármaco, o que pode demorar uma década, numerosas abordagens computacionais à bioinformática e à quimioinformática podem ser aplicadas em diferentes fases do processo de desenvolvimento para agilizar o processo (MARSHALL, 2004; MOHS; GREIG, 2017; ANVISA, 2022; LV *et al.*, 2023). Essas estratégias computacionais são utilizadas desde o final do século passado. Conhecidas como planejamento de fármacos com auxílio de computador (em inglês, *Computer-Aided Drug Design - CADD*) possuem duas grandes subdivisões, a direta, baseada na estrutura macromolecular de um alvo (em inglês, *Structure-Based Drug Design - SBDD*), e a indireta, baseada na

molécula do fármaco (em inglês, *Ligand-Based Drug Design - LBDD*). Essas abordagens incluem praticamente todas as técnicas como o “*de novo design*” para gerar moléculas inéditas, o enriquecimento estatístico para triagem virtual (em inglês, *High-Throughput Virtual Screening - HTVS*), a relação quantitativa entre estrutura e atividade (em inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship - QSAR*), a interação fármaco-alvo e a previsão de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade química (ADMET) (SELVARAJ *et al.*, 2021).

Atualmente, todas as técnicas utilizadas para descoberta de novos fármacos estão sendo rapidamente aglutinadas em modelos de aprendizado de máquina (CHEN *et al.*, 2023). As plataformas atuais estão reagrupando as técnicas em três grandes abordagens integradas, consistindo em mapeamento das ciências ômicas, mapeamento do universo químico e planejamento de testes clínicos (Figura 2). A primeira visa o entendimento da complexidade entre uma sequência de aminoácidos até suas isoformas tridimensionais nos tecidos. A segunda, na varredura do universo químico na busca de moléculas com propriedades físico-químicas desejadas. A terceira, em análises aprofundadas para planejamento de testes clínicos com o objetivo de aumentar a taxa de sucesso de aprovação das etapas, que inclui projeção de dose humana e planejamento de estruturas cristalinas para administração oral (LV *et al.*, 2023; KAMYA *et al.*, 2024).

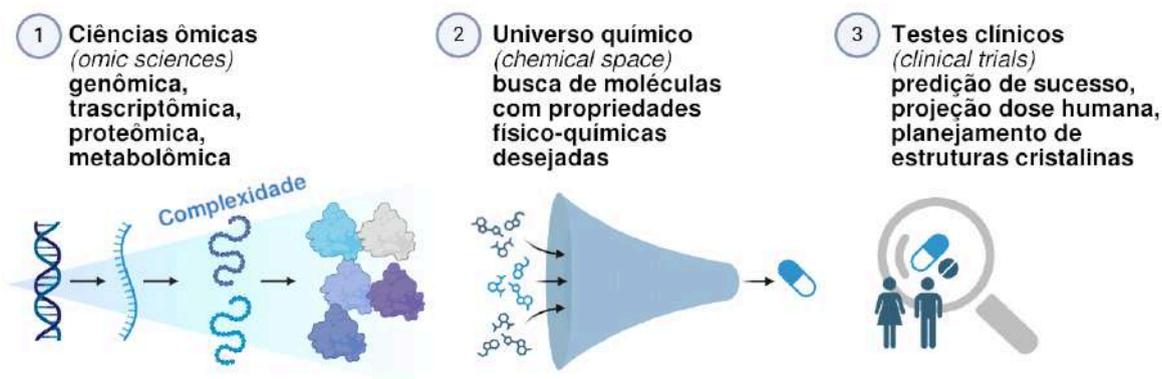


Figura 2. Três abordagens utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos: (1) mapeamento das ciências ômicas, (2) mapeamento do universo químico e (3) planejamento de testes clínicos.

Para as grandes empresas de biotecnologia, os testes experimentais *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* são etapas indissociáveis dos testes *in silico* e vice-versa. A busca moderna para aceleração está na racionalização e obtenção de maiores taxas de sucesso, sendo os experimentos laboratoriais um dos pilares para a validação dos ensaios *in silico*. Nesse cenário, em 2021, a empresa Evotec anunciou a entrada em testes clínicos (fase I) do primeiro fármaco inédito totalmente descoberto *in silico* utilizando técnicas modernas e integradas, reduzindo o tempo médio da descoberta de 5 anos para 8 meses (SAVAGE, 2021; VLADIMER *et al.*, 2022). Portanto, o crescimento de técnicas biotecnológicas computacionais é fundamental para impulsionar a transição de práticas mais eficientes e sustentáveis que beneficiem a saúde humana (KUSSMANN *et al.*, 2023).

1.3 SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

1.3.1 MODELAGEM MOLECULAR

Tradicionalmente, a modelagem molecular utiliza-se da abordagem direta para revelar os modelos atomísticos de macromoléculas. Através de uma estrutura conhecida, obtém-se um mapeamento molecular feito por equipamentos de cristalografia por difração de raios X (DRX) ou ressonância magnética nuclear (RMN), por exemplo. Porém, quando não se conhece a estrutura a ser isolada, utiliza-se a abordagem indireta, na qual compara-se moléculas ativas e inativas e, a partir de uma análise de complementaridade, desenvolve-se um modelo topográfico hipotético do sítio de ligação chamado de modelo farmacofórico (WU *et al.*, 2024). Ambos os casos fornecem informações a nível atomístico dos sistemas investigados. Muitas técnicas subsequentes somaram-se à simulação computacional de modelos moleculares para torná-la uma ferramenta poderosa. Modelos matemáticos para otimização geométrica das estruturas usando campo de forças para cálculos de mecânica molecular, métodos semi-empíricos e métodos *ab initio* transformaram assertivamente a modelagem molecular (HINCHLIFFE, 2006; KAMYA *et al.*, 2024).

No setor privado, foram investigadas a elucidação de estruturas utilizando-se ferramentas computacionais, como as criadas pela Google/DeepMind, empresa que desenvolveu o AlphaFold. A sua última versão, o AlphaFold3, demonstra alta precisão em suas predições estruturais virtuais e, em decorrência disso, os responsáveis foram laureados com o Nobel de Química em 2024 (NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY, 2024; ABRAMSON *et al.*, 2024).

Para o P2X7R, as informações moleculares e comportamentais foram pouco exploradas desde a descoberta da sua importância. Por se tratar de um canal de membrana plasmática, a complexidade da modelagem é maior (MICHEL *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

A estrutura molecular do P2X7R em mamíferos foi elucidada por Karasawa e Kawate (2016). Na época, foi publicada uma série de análises do canal, incluindo o mecanismo de ação não competitivo de cinco moléculas inibidoras e também o canal sem moléculas (forma *apo*). As análises foram realizadas através de DRX e revelaram os sítios alostéricos importantes para novos inibidores. Os dados estão disponíveis no banco de dados de proteínas (PDB) através dos identificadores 5U1L, 5U1U, 5U1V, 5U1W, 5U1X, 5U1Y e 5U2H. A partir disso, certificou-se que o P2X7R em mamíferos é composto por três subunidades homoméricas. Foi descrito que cada subunidade teria o formato de um golfinho, assim como outros membros da família P2X, em que a cabeça, nadadeiras, barbatanas e cauda correspondem às estruturas de alfa hélice e folhas beta mapeadas (Figura 3). Foram investigados também os três sítios de ligação do ATP próximos às nadadeiras do golfinho hipotético (KARASAWA; KAWATE, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

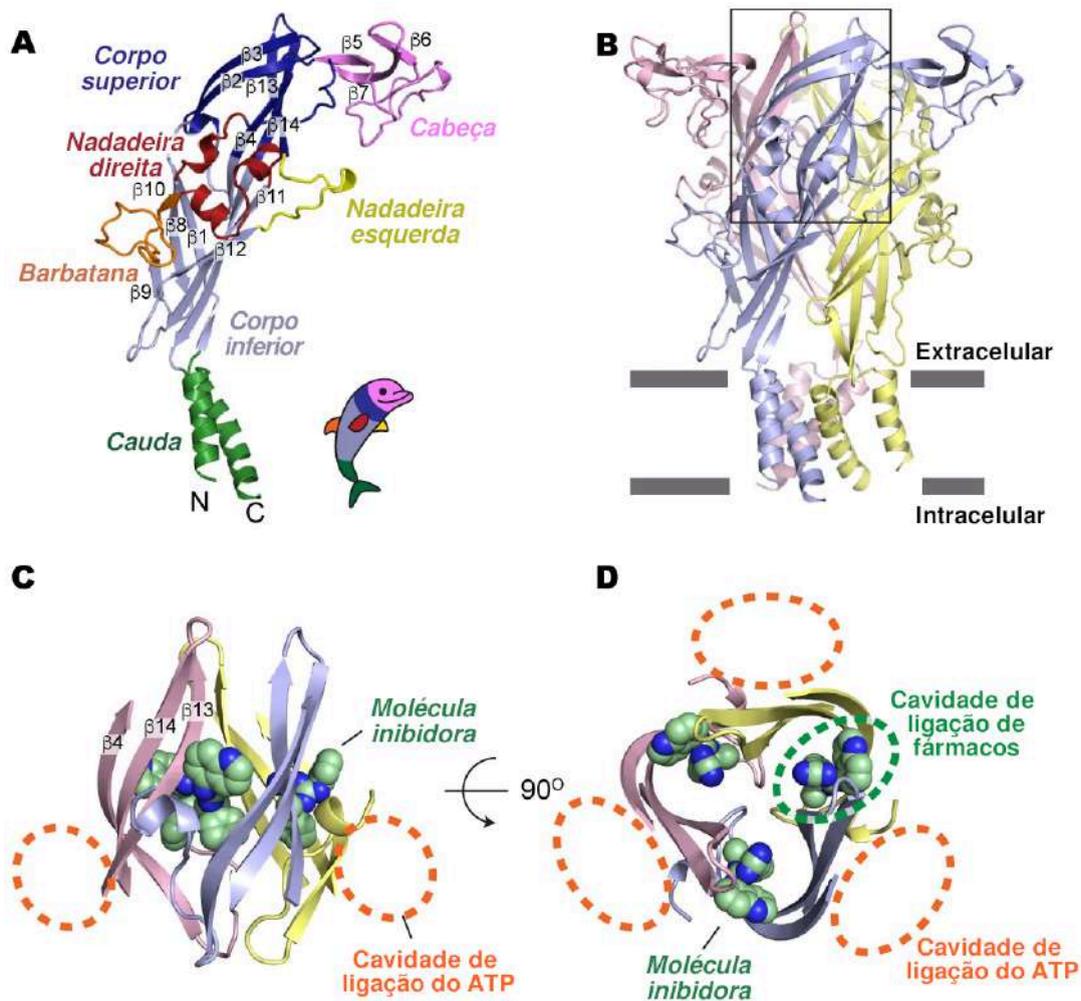


Figura 3. Representação do P2X7R através da modelagem molecular. (A) Mapeamento das regiões de folhas beta e alfa hélices em analogia à anatomia do golfinho. (B) Três subunidades homólogas formam o canal. (C) Visão lateral, destacada em B, com a cavidade de ligação do ATP. (D) Visão superior, destacando as três cavidades de ligação de ATP e as três cavidades de fármacos (Adaptado de KARASAWA; KAWATE, 2016).

1.3.2 TRIAGEM VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR

A triagem virtual e o *docking* molecular (ancoramento molecular) são técnicas amplamente utilizadas para prever como um estrutura química (molécula) liga-se a um alvo molecular (macromolécula) em nível atômico. Geralmente, o alvo molecular é uma proteína, no caso, as cavidades de interesse dessa proteína. Com isso, é possível entender o local de ligação da molécula e

discriminar os tipos de interações intermoleculares envolvidas na formação do complexo molecular ligante-receptor (LENGAUER, 1996; PAGADALA, 2017).

Apesar de serem dois métodos distintos, os algoritmos funcionam da mesma forma. A diferença consiste na quantidade de ligantes, enquanto a triagem virtual utiliza-se de milhares de moléculas resultando em dezenas, o *docking* aplica-se após a correção da ionização das dezenas de moléculas em pH predefinido no estudo. Existem diversos algoritmos para realização do *docking* molecular, entretanto, os programas iniciam com uma busca direcionada a partir das conformações moleculares e das interações eletrostáticas e, com isso, encontra-se um local para refinamento das possíveis interações intermoleculares.

No refinamento, avalia-se as forças de van der Waals, que desempenham um papel importante, assim como, as ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de π -stacking (empilhamento- π), ligações iônicas, ligação de halogênio e outras propriedades intermoleculares, gerando uma pontuação (*Score*) que estabelece a relação de afinidade entre ligante e receptor. Contudo, a definição do ligante-receptor mais estável deve-se à busca de milhares de conformações espaciais diferentes que sintetizam diversos valores de energia em uma posição favorável tridimensionalmente.

Resumidamente, a principal estratégia é manter o alvo molecular rígido com foco nas conformações dos ligantes, reduzindo o esforço computacional, tanto na primeira etapa de interações eletrostáticas, quanto na segunda etapa de refinamento de interações (MANDELL, 2001; PAGADALA, 2017). Ao considerar um alvo molecular rígido e o ligante flexível, os algoritmos de *docking* utilizam três tipos de buscas, sendo elas a sistemática, a determinística e a estocástica. A primeira fragmenta temporariamente o ligante, em pontos rotacionáveis, e ancora as partes em diferentes pontos do alvo molecular a fim de reconstruir virtualmente a molécula e verificar o encaixe. A segunda verifica o encaixe a partir de uma interface de interesse do ligante no alvo molecular. E a terceira, rotaciona aleatoriamente o ligante, gerando diversas novas conformações, com o objetivo de identificar as interações de menor energia. Todos esses métodos de buscas são considerados heurísticos e podem ser associados a algoritmos genéticos ou evolutivos (PAGADALA, 2017; PAGGI *et al.*, 2024).

Dessa forma, a robustez relatada por Thomsen e Christensen (2006) no programa *Molegro Virtual Docker* (MVD), em partes, se refere ao seu algoritmo evolutivo, em que é possível investigar de forma ampla diversos algoritmos de buscas com técnicas inspiradas na teoria da evolução darwiniana. Os algoritmos evolutivos, por sua vez, são técnicas utilizadas há mais de 50 anos na computação tendo como base a teoria de evolução darwiniana, porém muito distantes da evolução do mundo real, a principal semelhança consiste basicamente em uma população de indivíduos que serão gerados em condições aleatórias e aprimorados de acordo com a variação de suas taxas de mutação e recombinação, resultando em indivíduos aprimorados que dão descendência a novas proles, dando sequência ao processo até convergir para um resultado, neste caso, uma conformação tridimensional de ligante mais promissora (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019).

1.3.3 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

A simulação de dinâmica molecular (DM), por sua vez, é uma técnica versátil e difundida que contribui para análise do comportamento de sistemas complexos. A DM ajuda a entender o comportamento dinâmico de proteínas em diferentes escalas de tempo, desde movimentos rápidos até mudanças conformacionais lentas ou até mesmo processos de dobramento de proteínas. As análises complementam o experimento laboratorial e também oferecem uma forma de acompanhar processos difíceis de discernir com técnicas experimentais (SNOW *et al.*, 2004; ALONSO *et al.*, 2006; SALOMON-FERRER *et al.*, 2012).

As análises de DM realizada por Dos Santos e colaboradores (2020) da estrutura homotriméricas do canal P2X7 forneceu informações importantes dos componentes da membrana plasmática e da estrutura do canal na forma *apo* (Figura 4). Para maior robustez das análises, utiliza-se duas abordagens, a primeira sem ligantes (forma *apo*) para avaliar as conformações estruturais mais frequentes e a segunda, após a execução do *docking* molecular, para calcular com precisão as energias de ligação dos complexos ligante-receptor (ABRAHAM *et al.*, 2015).

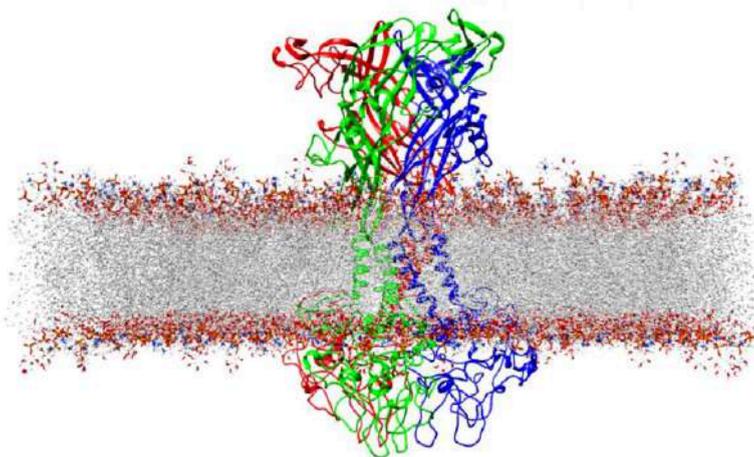


Figura 4. P2X7R inserido na bicamada lipídica representando a membrana plasmática, sem as moléculas de água e os íons para facilitar a visualização (Adaptado de DOS SANTOS *et al.*, 2020).

1.3.4 LIGANTES BIOATIVOS

A busca por substâncias bioativas faz parte dos pilares de estudos da farmacognosia, uma ciência pioneira que deu origem a diversas áreas. Há evidências arqueológicas que descrevem automedicação com uso de plantas medicinais no período pré-histórico por humanos e animais (não primatas), que incluem a aplicação dos compostos secundários de plantas (HARDY, 2020).

Produtos naturais, em especial os fitonutrientes, são conhecidos por conter diversas propriedades bioativas, entre elas antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras oriundas de substâncias químicas como, por exemplo, carotenoides, flavonoides e polifenóis (HOANG; KIM, 2021). Podendo ser considerada incalculável a quantidade de moléculas químicas bioativas possíveis matematicamente. As estimativas mais otimistas são na ordem de grandeza de 10^{60} moléculas e que somente com o auxílio de técnicas computacionais modernas seria possível entender uma parte desse universo (VILAR, 2012; PERCHA; ALTMAN, 2013; MULLARD, 2017).

Na modelagem molecular, a bioatividade é detectada a partir de diversos processos que visam classificar as propriedades farmacológicas e farmacocinéticas das moléculas. Em geral, o baixo peso molecular é importante para a investigação, pois métodos de otimização geométrica buscam encontrar

conformações tridimensionais mais estáveis, de baixa entropia. Assim, a molécula poderia mimetizar o comportamento encontrado experimentalmente e a possível interação seletiva entre ligante e receptor (HEHRE, 2003; HINCHLIFFE, 2006). Sendo assim, as técnicas também podem ser utilizadas para moléculas sintéticas auxiliando descobertas ou reposicionamento para novas aplicações farmacológicas, uma vez que as estruturas químicas de produtos naturais podem oferecer oportunidades ilimitadas para o desenvolvimento de moléculas inéditas devido à diversidade química (TAKEDA *et al.*, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

No entanto, o processo farmacêutico de descoberta é ainda mais intrincado do que somente a bioatividade, principalmente para medicamentos de administração por via oral. Muitas substâncias com bioatividade comprovada em determinado alvo molecular têm dificuldades para se tornar um produto terapêutico disponível no mercado, pois também precisam atender aos rigorosos, e necessários, testes de segurança e eficácia em humanos (LIPP, 2013). Nesse aspecto, os cocristais apresentam grande potencial para aprimorar a eficácia terapêutica dos fármacos, exercendo impacto significativo na pesquisa pré-clínica e no desenvolvimento de formas farmacêuticas. A cocrystalização pode auxiliar na modificação de propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de moléculas bioativas, sem alterar sua estrutura ou função química, a fim de obter os efeitos terapêuticos desejados e redefinir os rumos do desenvolvimento farmacêutico (GUAN *et al.*, 2021).

1.4 PLANEJAMENTO FARMACÊUTICO

1.4.1 TECNOLOGIA INDUSTRIAL FARMACÊUTICA

Faz parte da tecnologia industrial farmacêutica (TIF) avaliar e preservar as características de processabilidade, estabilidade, fluidez, entre outras que fazem o processo de produção do insumo farmacêutico ativo (IFA) reproduzível. Os IFAs, em sua maioria, são moléculas orgânicas de baixo peso molecular. Estas substâncias cristalizam principalmente em sistemas cristalinos conhecidos, como triclinico, monoclinico e ortorrômbico (BYRN *et al.*, 1999; FDA, 2004; WU *et al.*, 2015). As estruturas cristalinas influenciam o fluxo de pós e a preparação de

comprimidos na produção industrial, assim como, o desempenho farmacológico de formulações em uso terapêutico. A pesquisa e desenvolvimento de estruturas cristalinas conecta duas áreas farmacêuticas, a química medicinal e a tecnologia farmacêutica, auxiliando desde as etapas farmoquímicas até os estágios de aprimoramento das formulações existentes (TICEHURST; MARZIANO, 2015; HASKINS *et al.*, 2021).

No caso de produtos para administração via oral, a caracterização das propriedades físico-químicas sob a ótica do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) é fundamental. Substâncias classificadas como classe II ou IV, que possuem baixa solubilidade em meios aquosos na faixa de pH fisiológica do trato gastrointestinal (TGI), podem ter dificuldades na reprodutibilidade de seus testes de segurança e eficácia (Tabela 1). No entanto, algumas estratégias são utilizadas para modificar as propriedades físico-químicas do IFA, sendo uma delas a cocristalização, o que poderia reclassificar o IFA para classe I e, assim, garantir a biodisponibilidade necessária e reprodutível, facilitando a aprovação perante as agências regulatórias (KAWABATA *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2017).

Tabela 1. Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995).

CLASSE	SOLUBILIDADE	PERMEABILIDADE
I	ALTA	ALTA
II	BAIXA	ALTA
III	ALTA	BAIXA
IV	BAIXA	BAIXA

Ainda, se a proposta for de um novo fármaco, será necessário realizar estudos de possíveis polimorfismos e identificação de sistemas cristalinos para entender quais polimorfos são dissolvidos mais facilmente, como são os respectivos arranjos moleculares empacotados na célula unitária cristalina e também a estabilidade dos polimorfos (LIPP, 2013). Atualmente, o processo de produção de IFAs é desenvolvido com requisitos minuciosos que visam controlar toda a teoria de nucleação e crescimento a nível molecular dos cristais com

objetivo de garantir, com alta precisão, o rastreamento das estruturas cristalinas no produto final (BOLLA; NANGIA, 2016; GAO *et al.*, 2017; FDA, 2020).

Todas as análises prévias ganharam importância após a repercussão de casos graves como a talidomida no final da década de 1950 e início da década de 1960, em que seu isômero ótico (S)-talidomida, encontrado no medicamento, atuava como teratogênico quando usado por gestantes, resultando em malformações e mortes de milhares de bebês, diferentemente do (R)-talidomida indicado para náuseas e usado como sedativo (WNENDT *et al.*, 1996; GAO *et al.*, 2017). Outro exemplo foi o ritonavir que, em 1998, sua forma cristalina original foi rearranjada espontaneamente na formulação após 18 meses do lançamento do produto, revelando-se um novo polimorfo (Forma II) mais estável e menos solúvel, até então desconhecido, prejudicando a biodisponibilidade oral prevista e, conseqüentemente, o efeito terapêutico (BAUER *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2017). Após 24 anos desse acontecimento, cientistas descobriram por serendipidade um terceiro polimorfo (Forma III) do ritonavir em testes de nucleação com técnicas diferentes de cristalização, evidenciando inúmeras possibilidades ainda não descobertas para centenas de outros fármacos (YAO *et al.*, 2022).

A considerar todas as etapas do desenvolvimento do IFA, sendo elas planejamento, ensaios exploratórios, consolidação do processo e implantação na unidade industrial, o planejamento das estruturas cristalinas estaria focado nas duas primeiras fases, em que através de levantamento bibliográfico ou experimentos exploratórios poderia dar um indicativo de continuidade do desenvolvimento (BERNARDINO; MARICATO, 2021).

1.4.2 ESTRUTURAS CRISTALINAS DOS FÁRMACOS

Impulsionado pelos avanços na tecnologia de DRX, os estudos atomísticos das estruturas cristalinas começaram na década de 1950. Desde 1965, o banco de dados cristalográficos da Universidade de Cambridge (CCDC) concentrou-se no desenvolvimento de um banco de dados global chamado de *Cambridge Structural Database* (CSD) (GROOM *et al.*, 2016). O CSD, atualmente, contém resultados de mais de um milhão de análises experimentais envolvendo múltiplos

equipamentos e disponibiliza as estruturas 3D para pesquisadores em todo o mundo (SANJUAN-SZKLARZ *et al.*, 2020).

As possibilidades de combinações de geometrias e simetrias de cristais foram mapeadas, podendo a menor unidade repetitiva que produz a estrutura de um cristal, chamada de célula unitária, ter apenas sete formas: triclínica, cúbica, monoclínica, ortorrômbica, tetragonal, trigonal e hexagonal. As células unitárias em um cristal são do mesmo tamanho e possuem o mesmo número de moléculas ou íons organizados da mesma forma. Algumas das células unitárias podem adquirir geometrias específicas no espaço tridimensional, arranjando-se como face-paralela (monoclínico e ortorrômbico), corpo-centrado (cúbico, tetragonal e ortorrômbico) e face-centrada (cúbico e ortorrômbico). Estes arranjos tridimensionais cristalinos formam um total de 14 redes cristalinas de Bravais e 230 simetrias de grupos espaciais possíveis (BERNSTEIN, 2002; BERNSTEIN, 2007; HAHN, 2016). A influência da organização das células unitárias dos IFAs podem resultar em diferentes polimorfos, amorfos, solvatos, sais ou cocrystal (Figura 5) (PRADO *et al.*, 2020).

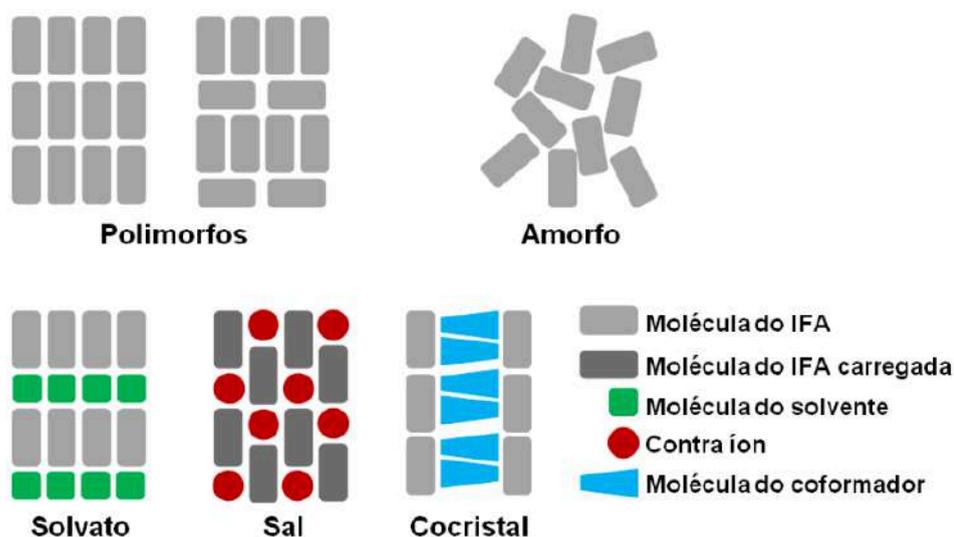


Figura 5. Tipos de estruturas cristalinas (Adaptado de PRADO *et al.*, 2020).

Embora a formação de sal seja o método mais comum utilizado para modificação das propriedades físico-químicas de uma molécula na formulação de um medicamento, esta opção necessita de grupos ácidos ou básicos adequados

para sua viabilidade (HALEBLIAN, 1975; DOMINGOS *et al.*, 2015). Por sua vez, os cocristais apresentam-se como uma alternativa e podem também auxiliar na modulação da taxa de dissolução (HASKINS *et al.*, 2021), higroscopia (TRASK *et al.*, 2005) e ponto de fusão (WALSH *et al.*, 2002). Ainda, os cocristais podem auxiliar a preservar a estabilidade termodinâmica no estado sólido ao mesmo tempo em que podem promover um aumento da biodisponibilidade em relação ao fármaco correspondente, em contraste às formas amorfas, por exemplo (BLAGDEN *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2024).

1.4.3 COCRISTAIS DE FÁRMACOS

Os cocristais foram introduzidos pela primeira vez na indústria farmacêutica no início dos anos 2000. Na época, buscava-se ultrapassar a barreira encontrada ao se utilizar o SCB como classificação de fármacos por via oral. A maioria das substâncias descobertas eram classificadas como classe II ou IV, em contraste com a proporção de classe I e III das substâncias aprovadas (Figura 6) (LIPP, 2013; JIANG *et al.*, 2014).

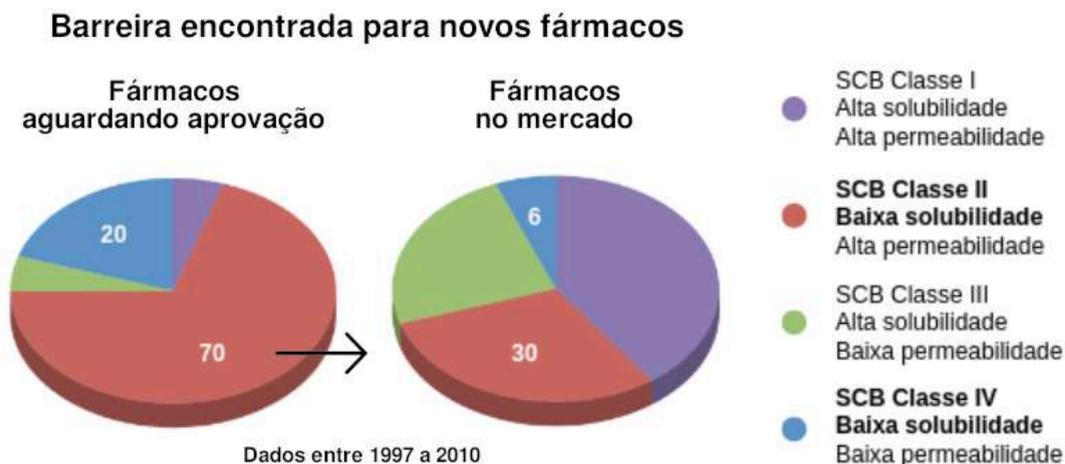


Figura 6. Fármacos classificados como classe II e IV na etapa de aguardando aprovação em comparação aos fármacos já aprovados no mercado no início do século XXI (Adaptado de LIPP, 2013).

Em 2012, a Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (em inglês, *FDA - U.S. Food and Drug Administration*) divulgou o primeiro guia de diretrizes especificamente para formas farmacêuticas de sólidos cocrystalais. No entanto, em 2002, anteriormente ao documento, o Lexapro[®] (cocrystal de escitalopram e ácido oxálico; PubChem CID 146571) foi aprovado para o tratamento de transtornos depressivos e de ansiedade com um coformador potencialmente tóxico, o ácido oxálico (BOEGESOE; JENS, 1990). Posteriormente, adotando-se medidas ambientais e de promoção da química verde com coformadores mais seguros, destacou-se o uso frequente de aminoácidos (NUGRAHANI; JESSICA, 2021). Em 2014, surgiu o primeiro fármaco com um coformador classificado entre as moléculas seguras (em inglês, *GRAS - Generally Recognized As Safe*), o medicamento Suglat[®] (ipragliflozina e L-prolina; PubChem CID 57339444) para o controle do diabetes tipo-2 (MASAKAZU *et al.*, 2012). Da mesma forma, o Odomzo[®] (cocrystal de sonidegibe e ácido fosfórico; PubChem CID 45138699) aprovado em 2015 para o tratamento de câncer (VINCENT; MICAH, 2012).

Na sequência, o Entresto[®] da Novartis surgiu como o primeiro produto comercial composto por duas moléculas bioativas a receber a aprovação da FDA em 2015 (LILI *et al.*, 2016). O cocrystal combina sacubitril e valsartana com propriedades natriuréticas e anti-hipertensivas, respectivamente. Apresenta maior biodisponibilidade do valsartana em comparação com suas formulações independentes (DYMACEK *et al.*, 2018). Outro produto de dupla ação comercializado foi o Seglantis[®], indicado para o controle da dor aguda em adultos, sendo um cocrystal de tramadol (agonista opioide) e celecoxibe (anti-inflamatório não esteroide) desenvolvido pela Kowa Pharm (GASCON *et al.*, 2019).

De forma geral, diversos cocrystalais de moléculas orgânicas, comparados a sua forma isolada, têm demonstrado melhor desempenho físico-químico relatados em solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade química, estabilidade térmica, propriedades mecânicas de compressão, entre outras (Tabela 2) (STEED, 2013; GAO *et al.*, 2017, GUAN *et al.*, 2021). Algumas substâncias orgânicas apresentam um aumento da solubilidade, que contribui também em um aumento da permeabilidade e, conseqüentemente, na otimização da biodisponibilidade (WANG *et al.*, 2024). Embora o parâmetro de permeabilidade seja um desafio de

mensuração em contraste ao de solubilidade, que possui técnicas bem estabelecidas *in vitro*, o aumento da permeabilidade de moléculas em cocristais se dá na utilização de coformadores orgânicos interagindo em um equilíbrio hidrofílico-lipofílico adequado observados em ensaios *ex vivo*, de membrana artificial *in vitro* e de monocamada celular *in vitro*. Os dados sugerem que não há uma relação diretamente proporcional à solubilidade. Em geral, as conclusões sobre o aumento de permeabilidade de fármacos em cocristais ainda são escassas, pois 80% da literatura relatada foca na solubilidade (SAMIE; ALAVIAN, 2024).

Tabela 2. Exemplos de modulação das propriedades físico-químicas de IFAs por meio de cocristais.

Propriedade(s)	Cocrystal(is)
Solubilidade e taxa de dissolução	<ul style="list-style-type: none"> • Quercetina e cafeína (SMITH <i>et al.</i>, 2011). • Andrographolide e ácido salicílico (SURESH <i>et al.</i>, 2013).
Estabilidade química	<ul style="list-style-type: none"> • Andrographolide e ácido salicílico (SURESH <i>et al.</i>, 2013).
Estabilidade térmica	<ul style="list-style-type: none"> • Cloreto de berberina e ácido fumárico (YANG <i>et al.</i>, 2020).
Mascaramento de sabor	<ul style="list-style-type: none"> • Cloreto de berberina e sacarina (WANG <i>et al.</i>, 2015).
Higroscopicidade	<ul style="list-style-type: none"> • Baicaleína e isoniazida (ZHU <i>et al.</i>, 2017).
Compactação de pó	<ul style="list-style-type: none"> • Baicaleína e nicotinamida (LIU <i>et al.</i>, 2018). • Cloreto de berberina e sacarina (WANG <i>et al.</i>, 2015).

1.4.4 PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS

Nesse cenário, as abordagens de química computacional para o estudo de estruturas cristalinas de fármacos são ferramentas essenciais para a análise dos rearranjos moleculares contidos na célula unitária. Essas técnicas possibilitam

estudar as interações intermoleculares e racionalizar as escolhas para obtenção experimental (LYAKHOV *et al.*, 2013; HASKINS *et al.*, 2021). No entanto, ainda não há difundida uma racionalização efetiva das melhores condições experimentais para obtenção de novas estruturas cristalinas de fármacos, da compreensão a nível molecular da formação e das propriedades de determinados cristais (BARDWELL *et al.*, 2011; CAPPUCINO *et al.*, 2022).

Atualmente, duas ferramentas estão ganhando destaque no planejamento de estruturas sólidas, a Google/GNoME (em inglês, *Graph Networks for Materials Exploration*) (MERCHANT *et al.*, 2023) e Microsoft/MatterGen (em inglês, *Generative Model for Inorganic Materials*) (ZENI *et al.*, 2023). Devido à extensa capacidade computacional dos seus criadores (Google e Microsoft), as ferramentas conseguem prever a estabilidade de milhões de materiais inéditos na natureza. Muitos materiais, segundo os autores, escaparam à intuição química humana em análises anteriores. No entanto, a exploração molecular feita por essas ferramentas está restrita às substâncias inorgânicas e aos cálculos de teoria do funcional da densidade (DFT) como aproximações de energias físicas (MERCHANT *et al.*, 2023; ZENI *et al.*, 2023).

Tradicionalmente, os cálculos de DFT oferecem resultados melhores que o método Hartree-Fock (HF) pois incluem a correlação eletrônica como parâmetros, apesar de ambos os métodos serem usados para descrever os estados quânticos de sistemas contendo muitos elétrons. Os algoritmos atuais baseiam-se em DFT, na teoria de perturbação de muitos corpos e nos pseudopotenciais. Isso envolve resolver a equação de Schrödinger para cada elétron iterativamente até que a autoconsistência (SCF) seja alcançada. Esse processo utiliza-se de algoritmos para correlação eletrônica garantindo sua alta precisão, por esse motivo, o poder computacionalmente relativamente alto principalmente para sistemas complexos (FORESMAN; FRISCH, 2015; GIANNOZZI *et al.*, 2017).

Sendo assim, a escolha da metodologia pode reduzir determinados gargalos na execução dos cálculos. Para grandes indústrias, a solução encontrada foram salas robotizadas com experimentos autônomos que fornecem dados em tempo real para os algoritmos integrados com o experimental. No entanto, quando utiliza-se somente os cálculos teóricos, faz-se necessário avaliar por diferentes

métodos a estrutura eletrônica de fármacos, afinal o planejamento de estruturas sólidas de moléculas orgânicas depende de análises mais aprofundadas (GIANNOZZI *et al.*, 2017; SZYMANSKI *et al.*, 2023).

Nesta perspectiva, principalmente pela utilização de cálculos quânticos de elevado custo computacional, algumas técnicas são importantes de serem realizadas em etapas anteriores, como o *docking* molecular somente de moléculas de baixo peso molecular. Sendo etapas auxiliadoras no direcionamento e triagem, uma vez que as interações intermoleculares descritas pelo algoritmo também são importantes propriedades supramoleculares das estruturas cristalinas (HINCHLIFFE, 2006; DESIRAJU, 2013; LIANG *et al.*, 2016).

Sistemas cristalinos estáveis de moléculas orgânicas, a partir de milhares rearranjos moleculares em diferentes proporções, podem fornecer *insights* valiosos para indústria e pesquisa farmacêutica, pois tem sua aplicação em melhoria nas formulações existentes, otimização dos experimentos laboratoriais, investigação de novas patentes e redução de riscos em formulações de alto custo (BERNSTEIN, 2007; LIPP *et al.*, 2013; CAPPUCINO *et al.*, 2022).

1.5 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos medicamentos é um processo longo e complexo, que pode levar mais de uma década desde o mapeamento de alvos biológicos até a chegada do fármaco ao mercado. Ao longo desse percurso, ferramentas computacionais têm sido fundamentais, especialmente nas etapas iniciais, quando se busca identificar possíveis ligantes para alvos moleculares específicos. A utilização de dados disponíveis em bancos especializados, aliada a técnicas de aprendizado *in silico*, acelera significativamente esse processo (MARSHALL, 2004; MOHS; GREIG, 2017; LV *et al.*, 2023).

Apesar dos avanços recentes, ainda há uma demanda crescente por medicamentos anti-inflamatórios mais seguros e eficazes. Muitas terapias atuais apresentam limitações clínicas, o que impulsiona a busca por novas moléculas com melhor desempenho terapêutico. Nesse cenário, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias que viabilizem o reposicionamento de fármacos, a

redução de custos e riscos para os pacientes, além da diminuição do tempo necessário para a descoberta e disponibilização dos medicamentos no mercado (PERCHA; ALTMAN, 2013; TSAO *et al.*, 2023; YU *et al.*, 2023). Diante da associação de processos inflamatórios à abundância do P2X7R expresso nas células moduladoras da inflamação, a identificação de moléculas capazes de inibir sua atividade representa uma estratégia promissora. Avanços nessa área podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes, promovendo a melhoria da qualidade de vida de pacientes acometidos por doenças inflamatórias e imunossupressoras (BHATTACHARYA; BIBER, 2016).

Outra abordagem promissora envolve estratégias voltadas ao planejamento farmacêutico dos processos de recristalização, que tem evoluído de uma prática empírica para uma abordagem cada vez mais fundamentada em teorias físico-químicas, contribuindo para as primeiras etapas do desenvolvimento do IFA. Contudo, apesar da aplicação crescente de métodos para obtenção de novas formas sólidas cristalinas de fármacos, ainda há uma lacuna significativa no planejamento racional dessas etapas. O desenvolvimento de métodos computacionais aplicados ao estudo e planejamento de cocrystalização representa uma oportunidade concreta para acelerar a inovação no setor farmacêutico (LIPP *et al.*, 2013; HASKINS *et al.*, 2021; CAPPUCCINO *et al.*, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a triagem virtual para descoberta de potenciais inibidores do receptor P2X7 e realizar o planejamento das estruturas cristalinas de cocristais das moléculas candidatas elegíveis, visando indicar um cocrystal mais promissor para o desenvolvimento de um complexo molecular cristalino mais efetivo quanto à solubilidade do fármaco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar biblioteca de moléculas.
- Preparar as estruturas tridimensionais das moléculas.
- Preparar a estrutura tridimensional do receptor P2X7.
- Realizar otimização geométrica das moléculas da biblioteca.
- Realizar triagem virtual dos ligantes otimizados.
- Realizar *docking* molecular dos potenciais ligantes selecionados.
- Realizar simulação de dinâmica molecular dos principais ligantes bioativos selecionados.
- Analisar os potenciais ligantes elegíveis para estudo das estruturas cristalinas de cocristais.
- Selecionar as estruturas cristalinas dos coformadores dos dados cristalográficos do *Cambridge Structural Database* (CSD).
- Realizar otimização geométrica das moléculas candidatas e dos coformadores.
- Realizar triagem dos potenciais coformadores.
- Obter os complexos moleculares cristalinos entre os fármacos e coformadores.
- Realizar otimização geométrica dos complexos moleculares cristalinos.
- Analisar os potenciais cocristais.

- Propor os potenciais sistemas cristalinos a partir dos complexos moleculares favoráveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi dividido em duas principais etapas para execução, a primeira envolve a triagem e descoberta de novos inibidores bioativos para o P2X7R, em que as técnicas de modelagem molecular estão relacionadas às análises de ligante-receptor e na caracterização dos ligantes *in silico*. Nesta etapa, também foram realizados os ensaios *in vitro* (IC50), por colaboradores do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA/IOC/FIOCRUZ), para validação da bioatividade dos novos inibidores encontrados. As quatro substâncias altamente seletivas para o P2X7R foram analisadas em sistemas individuais (complexo ligante-receptor) em simulação de dinâmica molecular para demonstração da estabilidade da afinidade em relação ao tempo. A segunda etapa, após a identificação das quatro moléculas mais promissoras, consiste em planejar as estruturas cristalinas mais promissoras com possíveis substâncias coformadoras para a obtenção de cocristais. Utilizou-se métodos da mecânica quântica em que é possível classificar as estruturas mais estáveis e indicar as mais prováveis a gerar um produto final aprimorado de acordo com o sistema cristalino mais adequado (Figura 7).

Portanto, o desenvolvimento do projeto abrange tanto a parte inicial da descoberta de novos fármacos, quanto a parte inicial das etapas de desenvolvimento do IFA em que é possível planejar as estruturas cristalinas das substâncias no intuito de fornecer dados para o entendimento das técnicas de produção, tanto em laboratórios quanto em escala industrial de um possível produto.

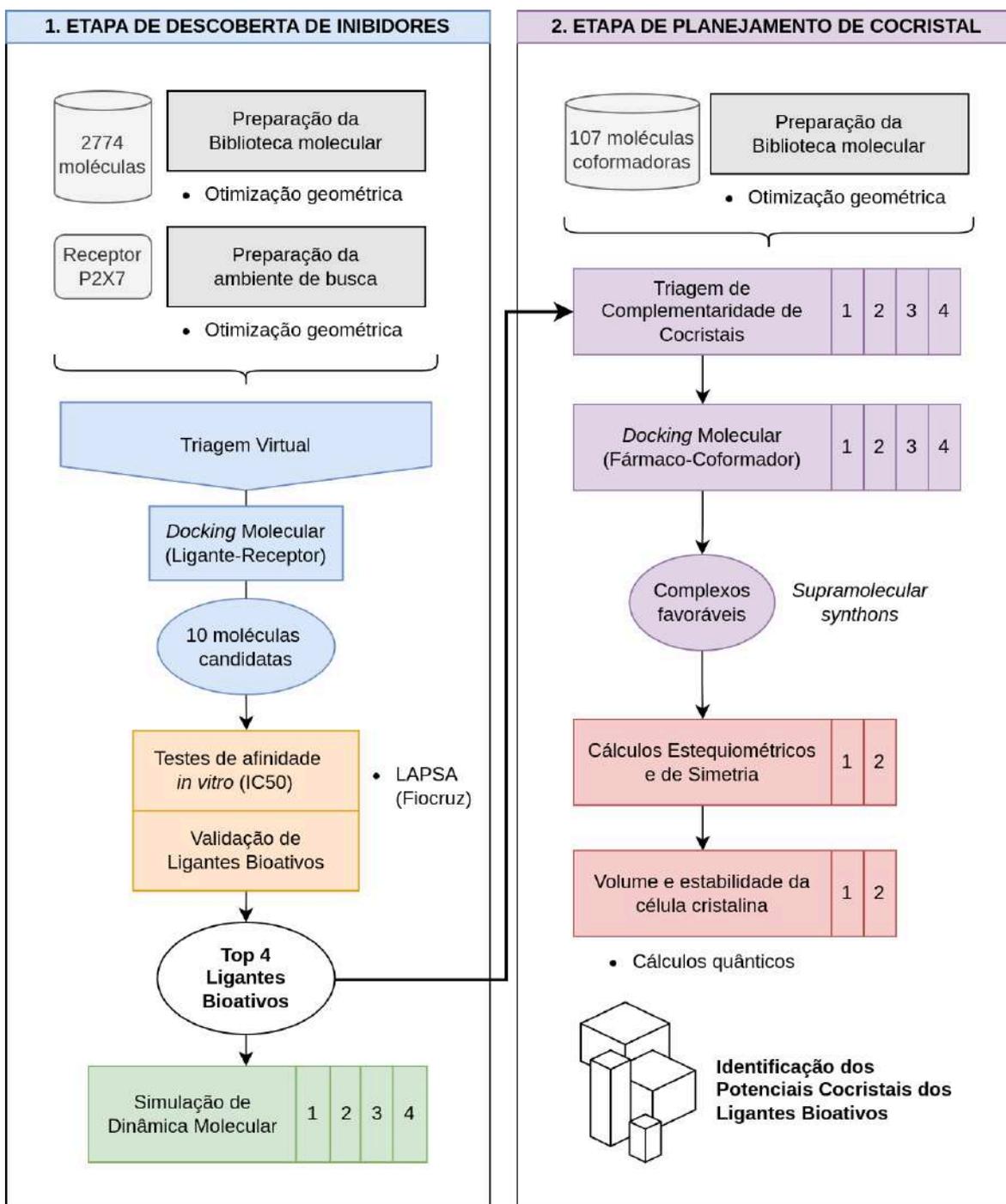


Figura 7. Fluxograma de execução do projeto dividido em duas principais etapas, a primeira vinculada à descoberta de fármacos e a segunda etapa de planejamento de potenciais cocristais.

3.1 DESCOBERTA DE FÁRMACO

3.1.1 MODELAGEM MOLECULAR DE LIGANTE E RECEPTOR

Para os ligantes, utilizou-se a biblioteca de substâncias da *Selleckchem* (*Selleck Chemicals*[®]), seção de imunologia e inflamação contendo 3.405 moléculas. No entanto, os registros possuem diversas inconsistências que foram avaliadas manualmente, como moléculas ionizadas, sem hidrogênios ou duplicadas. Sendo assim, as estruturas foram corrigidas e otimizadas geometricamente, em campo de forças MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) (HALGREN, 1996; HANWELL *et al.*, 2012) para minimização da energia. Todas as moléculas foram avaliadas e verificadas utilizando o programa *Marvin Suite 6.1* (*Chemaxon*[®]).

Para o receptor, a sequência de aminoácidos das subunidades P2X7R (código de acesso: Q9Z1M0, *Mus musculus*) foi obtida do Universal Protein Resource (UniProt) (UNIPROT CONSORTIUM, 2019) do camundongo para que o modelo tenha convergência com os ensaios *in vitro* subsequentes. O template molecular foi obtido do RCSB Protein Data Bank (PDB ID: 5U1L) (BERMAN *et al.*, 2000). O modelo tridimensional inicial da proteína foi gerado usando o programa LOMETS (ZHENG *et al.*, 2019). Os modelos de estrutura molecular tridimensional de proteínas foram refinados usando o programa ModRefiner (XU; ZHANG, 2011). A qualidade estrutural do modelo foi avaliada através do gráfico de Ramachandran, QMEAN Z-scores e uma comparação com um conjunto não redundante de estruturas PDB utilizando-se o servidor SWISS-MODEL (WATERHOUSE *et al.*, 2018). O programa gráfico PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) foi utilizado para visualizar e analisar os complexos moleculares otimizados.

3.1.2 TRIAGEM VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR

Após a definição da biblioteca de ligantes, a área de busca no receptor foi definida na porção extracelular do receptor sendo uma esfera de 32 Å de raio. A triagem virtual para descoberta de novos inibidores foi realizada pelo programa

Molegro Virtual Docker versão 6.0 (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) em triplicata. E a classificação do critério de escolha das moléculas utilizadas nessa etapa foi o valor de pontuação *Rerank score* fornecido pelo programa, sendo os menores valores os mais favoráveis. Sendo assim, foram selecionadas 10% das moléculas para uma análise mais precisa de energia na realização do *docking* molecular, resultado em 10 moléculas finais. O *docking* molecular entre os 10 ligantes mais promissores foi realizado utilizando o programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) e adicionou-se outros dois ligantes conhecidos por ter alta afinidade e seletividade com o receptor P2X7, sendo um potente inibidor denominado de A740003 (HONORE *et al.*, 2006) e o ATP, para compor análise comparativa. O *docking* molecular foi realizado com 100 execuções para cada molécula e com limite de 5.000 interações em cada execução. O programa gráfico PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) foi utilizado para visualizar e analisar os complexos moleculares otimizados.

3.1.3 ENSAIOS *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* de IC50 foram realizados em colaboração com o Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA/IOC/FIOCRUZ). Foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongo linhagem *Webster* suíço de acordo com o protocolo interno estabelecido pelo laboratório. O Comitê de Ética Animal da Instituição aprovou todos os protocolos experimentais sob o número L039-2019.

A observação da formação de poros associada ao P2X7R foi examinada e avaliada por ensaio de captação do corante iodeto de propídio. As células foram obtidas por lavagem e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. O número de células utilizadas por poço foi de $3,0 \times 10^5$. O ensaio consistiu na incubação dos ligantes selecionados na triagem virtual (em concentrações que variaram de 1 pM a 100 μ M) e do inibidor A74003 (em concentrações que variaram de 10 nM a 50 μ M) por 5 min. Após essa etapa, as células foram expostas a 300 μ M de BzATP por 15 min e, nos últimos 5 min, 750 nM de corante iodeto de propídio foram adicionados a todos os poços. Ao final da incubação, a leitura no espectrofotômetro

SpectraMax M5 foi realizada a 493/636 nm (excitação/emissão). As substâncias que apresentaram resultados de inibição superiores a 50% foram selecionadas para avaliar sua atividade inibitória em concentrações variadas.

3.1.4 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

Além da análise do *docking* molecular verificou-se o comportamento dos ligantes com alta afinidade em DM. Para isso, foi necessário simular também a bicamada fosfolipídica da membrana celular na qual o canal está imerso, além das moléculas de solvatação (água e íons) na proporção correta e neutra. Nesta etapa utilizou-se o programa CHARMM-GUI server (JO *et al.*, 2007; JO *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2019), que auxilia na preparação da caixa para posterior simulação. Os componentes químicos da membrana foram definidos a partir de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a proporção dos lipídios e fosfolipídios estabelecidas para garantir a estabilidade da membrana são de colesterol em 12,96%, fosfatidilcolina em 46,96%, fosfatidiletanolamina em 25,91%, fosfatidilserina em 2,02%, fosfatidilinositol em 10,12% e esfingo em 2,02% (Tabela 3) (DOS SANTOS *et al.*, 2020).

Tabela 3. Parâmetros utilizados para definição da bicamada lipídica da membrana celular (DOS SANTOS *et al.*, 2020).

Espessura da camada de água	25 nm
Proporção das dimensões (extracelular/intracelular)	1:1
CHL1 - colesterol	12,96 %
POPC - fosfatidilcolina	46,96 %
POPE - fosfatidiletanolamina	25,91 %
POPS - fosfatidilserina	2,02 %
SAPI - fosfatidilinositol	10,12 %
PSM - esfingo	2,02 %

Todas as DM foram realizadas usando o programa AMBER 2023 (CASE *et al.*, 2023). Os complexos moleculares dos ligantes mais promissores, juntamente com o P2X7R, usados para DM, foram gerados pelo CHARMM-GUI (WU *et al.*, 2014). Uma caixa cúbica neutra contendo moléculas de água, cátions sódio (Na⁺) e ânions cloro (Cl⁻) e o P2X7R de camundongo inserido em membrana formada por uma bicamada lipídica foi gerada para cada complexo ligante-receptor. Os campos de força AMBER empregados foram FF19SB, Lipid21, TIP3P e GAFF2 para proteína, lipídio, água e ligante, respectivamente. Antes da simulação entrar na etapa de produção, a minimização do complexo foi realizada pelo algoritmo *Steepest Descent*. Na etapa de equilíbrio, utilizou-se a malha de partículas Ewald para interações eletrostáticas com *cutoff* de 9 Å, o mesmo valor foi definido para interações de van der Waals. Para estabilizar o sistema, cinco simulações NVT (volume constante) foram realizadas por 1 nanossegundo à 303,15 K, em seguida, uma simulação NPT (pressão constante) de 1 nanossegundo à 303,15 K e pressão à 1 bar usando barostato de Berendsen para manter a temperatura e a pressão estáveis. A simulação de produção foi realizada em NPT por 100 nanossegundos, 303,15 K, 1 bar, Langevin e Berendsen para temperatura e estabilização de pressão, respectivamente. Partículas Ewald e van der Waals com *cutoff* de 9 Å. O intervalo de tempo utilizado na simulação de produção foi definido em 2 femtossegundos.

A análise da trajetória de DM foi realizada utilizando os programas PTRAJ e CPPTRAJ presentes no pacote do programa AMBER 2023, empregando as funções *atomicfluct* e *rmsd* para obter os gráficos de raiz da flutuação quadrática média (RMSF) e raiz da flutuação média desvio quadrado (RMSD), respectivamente.

Para os cálculos de energia livre de ligação, foi utilizado o método MM-PBSA (Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann), que calcula diferentes tipos de termos energéticos, como van der Waals, eletrostática e energia de polarização entre os ligantes e o receptor (MILLER *et al.*, 2012). Este cálculo leva em consideração variações conformacionais ao longo de uma trajetória, portanto foram considerados apenas os últimos 5 nanossegundos de

cada sistema ligante-receptor, visando calcular apenas a porção da simulação onde o sistema molecular permaneceu mais estável.

3.2 PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS

3.2.1 BIBLIOTECA DE COFORMADORES

A biblioteca de 107 coformadores foi obtida do banco de dados cristalográficos da Universidade de Cambridge (CCDC) na seção de moléculas para cocristais (Tabela 4) (GROOM *et al.*, 2016). Utilizou-se o programa Avogadro para o cálculo de otimização geométrica inicial e minimização da energia em campo de forças MMFF94 (HALGREN, 1996; HANWELL *et al.*, 2012). Foi realizada uma conferência visual da estereoquímica das estruturas no programa *Marvin Suite 6.1 (Chemaxon®)*, que possibilitou avaliar os carbonos quirais e identificar os estereoisômeros com o objetivo de manter o padrão das estruturas. No programa MOPAC2016, foi realizado o refinamento de otimização geométrica em método semi-empírico de mecânica quântica, o PM7 (STEWART, 2016). Com isso, pode-se obter uma biblioteca com otimização geométrica refinada para investigação de potenciais cocristais.

Tabela 4. Biblioteca de 107 coformadores utilizadas para triagem de cocristais.

3-Metilpiridina	Ácido L-mandélico	Glicina
Acessulfame	Ácido L-pipecólico	Hesperetina
Alitame	Ácido L-piroglutâmico	Imidazol
Apigenina	Ácido L-tartárico	Isonicotinamida
Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	Ácido L-láctico	L-arginina
Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	Ácido lactobiônico	L-fenilalanina
1-hidroxi-2-naftoico	Ácido maleico	L-glutamina
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	Ácido málico	L-glutationa
Ácido 2-amino-5-metilbenzoico	Ácido malônico	L-leucina
Ácido 3-hidroxi-2-naftoico	Ácido metanossulfônico	L-metionina
Ácido 4-acetamidobenzoico	Ácido nicotínico	L-prolina
Ácido 4-aminobenzoico	Ácido orótico	L-serina
Ácido 4-hidroxibenzoico	Ácido oxálico	L-tirosina
Ácido 6-hidroxi-2-naftoico	Ácido pamoico	L-triptofano
Ácido acetileno dicarboxílico	Ácido p-toluenossulfônico	Lactose
Ácido acético	Ácido pimélico	Maltitol
Ácido adípico	Ácido pirazina-2-carboxílico	Manitol
Ácido azelaico	Ácido salicílico	Metilparabeno
Ácido benzoico	Ácido sórbico	Monobutirina
Ácido benzenossulfônico	Ácido subérico	N-etilacetamida
Ácido cítrico	Ácido succínico	Nicotinamida
Ácido cólico	Ácido tartárico	Oxima de
Ácido etanossulfônico	Ácido trifenilacético	acetofenona
Ácido fólico	Ácido (-)-cânforsulfônico	Piperazina
Ácido fumárico	Ácido (+)-cânforico	Pirazol
Ácido gentísico	Biotina	Pirazina
Ácido glicólico	Cafeína	Propilparabeno
Ácido glutárico	Capsaicina	Riboflavina
Ácido hipúrico	Caprolactama	Sacarina
Ácido hidroxicinâmico	D-alanina	Teofilina
Ácido cetoglutárico	D-pantotenol	Timidina
Ácido D-glicurônico	D-prolina	t-Butil-hidroxi-anisol
Ácido D-pipecólico	EDTA	t-Butilamina
Ácido L-aspártico	Etil maltol	Ureia
Ácido L-aspártico-Z	Etilparabeno	Valerolactona
Ácido L-glutâmico	Ftalimida	Xantina
Ácido L-glutâmico-Z		

3.2.2 TRIAGEM VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR

Para a triagem inicial, utilizou-se o módulo *CSD-Materials* do programa Mercury 4.0 que possibilitou uma varredura de complementaridade de cocristais (GROOM *et al.*, 2016). Através do programa, para cada molécula foram gerados 100 confôrmeros para iniciar a triagem. Na opção "*CSD-Materials > Co-Crystal*

Design > Screen by Molecular Complementarity..." do programa, foram selecionadas todas as moléculas da biblioteca de coformadores para a varredura. Ao final da execução, o programa informa quais coformadores provavelmente formariam um cocrystal, entretanto, o objetivo desta análise é descartar quais coformadores são improváveis de formar cocrystal, pois a funcionalidade não classifica em ordem de prioridade a probabilidade de cocrystalização, então deve-se considerar apenas os coformadores que têm qualquer taxa de acerto acima de zero e descartar o restante.

Para o *docking* molecular, utilizou-se o programa MVD para identificação das posições mais favoráveis dos coformadores com os novos inibidores mais promissores. A área de busca em torno das moléculas foi de 15 Å de raio da esfera para inicialização do *docking* molecular sem proteína. A configuração dos parâmetros do *docking* foi definida com a resolução de busca de 0,20 Å para o *MolDock Score* e uma avaliação de ligantes, no caso os coformadores, personalizada com as opções "*Internal ES*", "*Internal HBond*" e "*Sp2-Sp2 Torsions*", que respectivamente significam, se as interações eletrostáticas internas devem ser calculadas para um encaixe, se um encaixe pode ter ligações de hidrogênio e se um diedro adicional com ângulos flexíveis deve ser adicionado para levar em consideração as ligações sp^2-sp^2 . O algoritmo de busca selecionado foi o "*MolDock Optimize*", com o número de execuções definido em "100 runs" para cada coformador, e as opções de minimização de energia e de otimização de ligação hidrogênio selecionadas para serem executadas após cada execução (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

3.2.3 CÁLCULOS DE PROPORÇÃO E SIMETRIA

Nas etapas subsequentes o tempo de processamento (custo computacional) é significativamente maior. Portanto, se faz necessária a classificação das interações moleculares, em que apenas os coformadores com energia de afinidade relativamente melhores do que a própria molécula serão selecionados para o planejamento dos cocrystal. Portanto, foi avaliada a afinidade entre si das substâncias selecionadas na etapa de descoberta. Esta análise também pode

oferecer *insights* sobre potenciais desafios durante a recristalização de cocristais em experimentos de laboratório. Para elucidação da relação estequiométrica entre o fármaco candidato e o coformador utilizou-se o programa USPEX v10.5, que avalia e determina a proporção ideal entre os compostos, além dos cálculos de simetria da célula unitária cristalina, avaliando a energia de formação de cristais (OGANOV; GLASS, 2006; OGANOV *et al.*, 2011; LYAKHOV *et al.*, 2013).

A previsão da célula unitária cristalina consiste em realizar uma busca abrangente por sistemas cristalinos altamente estáveis utilizando um algoritmo multimétodo integrado ao algoritmo PWscf (*Plane-Wave Self-Consistent Field*) do programa Quantum ESPRESSO associado ao USPEX (GIANNOZZI *et al.*, 2009; GIANNOZZI *et al.*, 2017). Esta integração oferece uma vantagem significativa, pois o USPEX examina moléculas em proporções variadas para a avaliação de simetrias, a preservação da integridade de cada molécula (fármaco principal e coformador) e avalia a estabilidade do sistema cristalino através dos cálculos de mecânica quântica de DFT. A biblioteca Seaborn do Python também foi utilizada para gerar informações gráficas e selecionar os melhores sistemas de cocrystal.

3.2.4 CÁLCULOS DE ESTABILIDADE DA CÉLULA CRISTALINA

Para refinar as estruturas cristalinas geradas, utilizou-se o algoritmo “relaxamento de células variáveis” (*vc-relax*) do Quantum ESPRESSO (GIANNOZZI *et al.*, 2009; GIANNOZZI *et al.*, 2017), que otimiza posições atômicas, formato e volume da célula unitária cristalina. Os arquivos de entrada foram gerados utilizando o programa BURAI v1.3 a partir do arquivo CIF (NISHIHARA, 2018). Este processo de refinamento é demorado e pode levar vários dias para alcançar a convergência. Durante o cálculo, a entalpia de formação irá convergir gradativamente a cada ciclo de SCF, e o volume da célula unitária diminuirá devido à alta pressão, com o objetivo de identificar os rearranjos mais estáveis e com entalpia de formação favoráveis para a formação de um cocrystal. O arquivo de saída do Quantum ESPRESSO fornece informações para um monitoramento de cada ciclo do cálculo por meio de um algoritmo

personalizado ou através dos programas XCrySDen v1.6.2 ou VESTA v3.5.7 de visualização gráfica (KOKALJ, 2003; MOMMA; IZUMI, 2011).

4 RESULTADOS

4.1 DESCOBERTA DE NOVOS INIBIDORES DE P2X7R

4.1.1 MODELAGEM MOLECULAR DOS LIGANTES E RECEPTOR

A modelagem molecular dos ligantes foi conduzida em 2.774 de 3.405 moléculas, pois foram removidas as moléculas incorretas, duplicadas e contra-íons. Dessas 2.774 substâncias foram aplicados os cálculos de minimização de energia em campo de forças MMFF94, resultando em conformações ideais para serem investigadas. Este processo foi realizado analisando uma a uma em formato de grade na interface do programa Marvin.

Para o receptor P2X7, após a modelagem comparativa, as etapas de validação indicaram resultados de qualidade satisfatória, com a estereoquímica e a qualidade estatística favoráveis. O gráfico de Ramachandran com valor de 97,7% e o QMEANDisCo de 0,65 (Figura 8). A estrutura do P2X7R apresentou a qualidade esperada nas regiões de interesse para a triagem virtual no dado experimental do PDB.

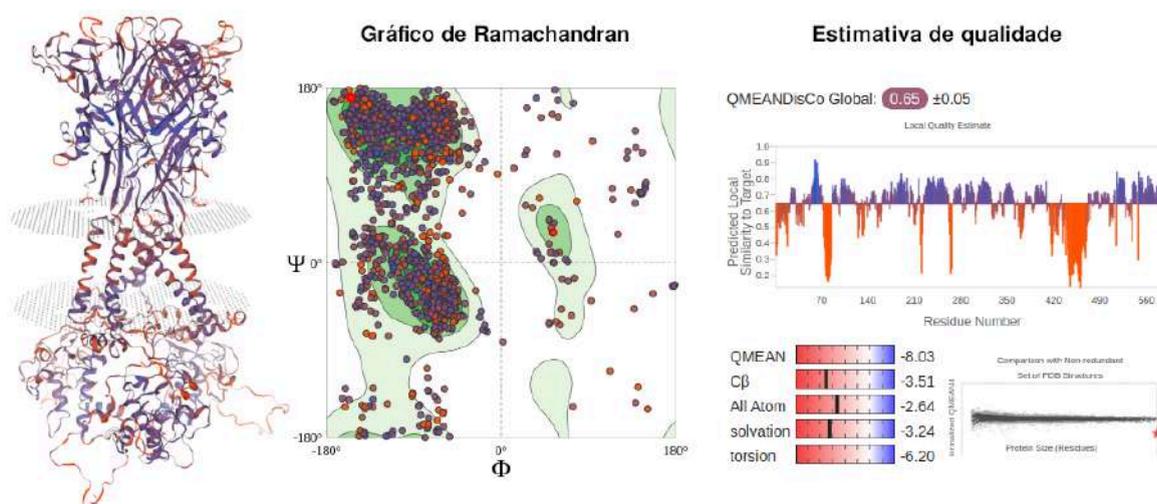


Figura 8. Estrutura do P2X7R com partes azul indicando a qualidade do modelo, gráfico de Ramachandran demonstrando a estereoquímica dos aminoácidos em regiões favoráveis e os resultados de estimativa de qualidade indicando as regiões de interesse como viáveis para análise.

4.1.2 TRIAGEM VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR

Após a triagem virtual, foram selecionados dez ligantes mais promissores. Narirutina, diosmina, complanatusida, hesperidina, oroxina B, itacitinibe, ácido litospermico, lifitegrast, LDC1267 e velpatasvir (Figura 9).

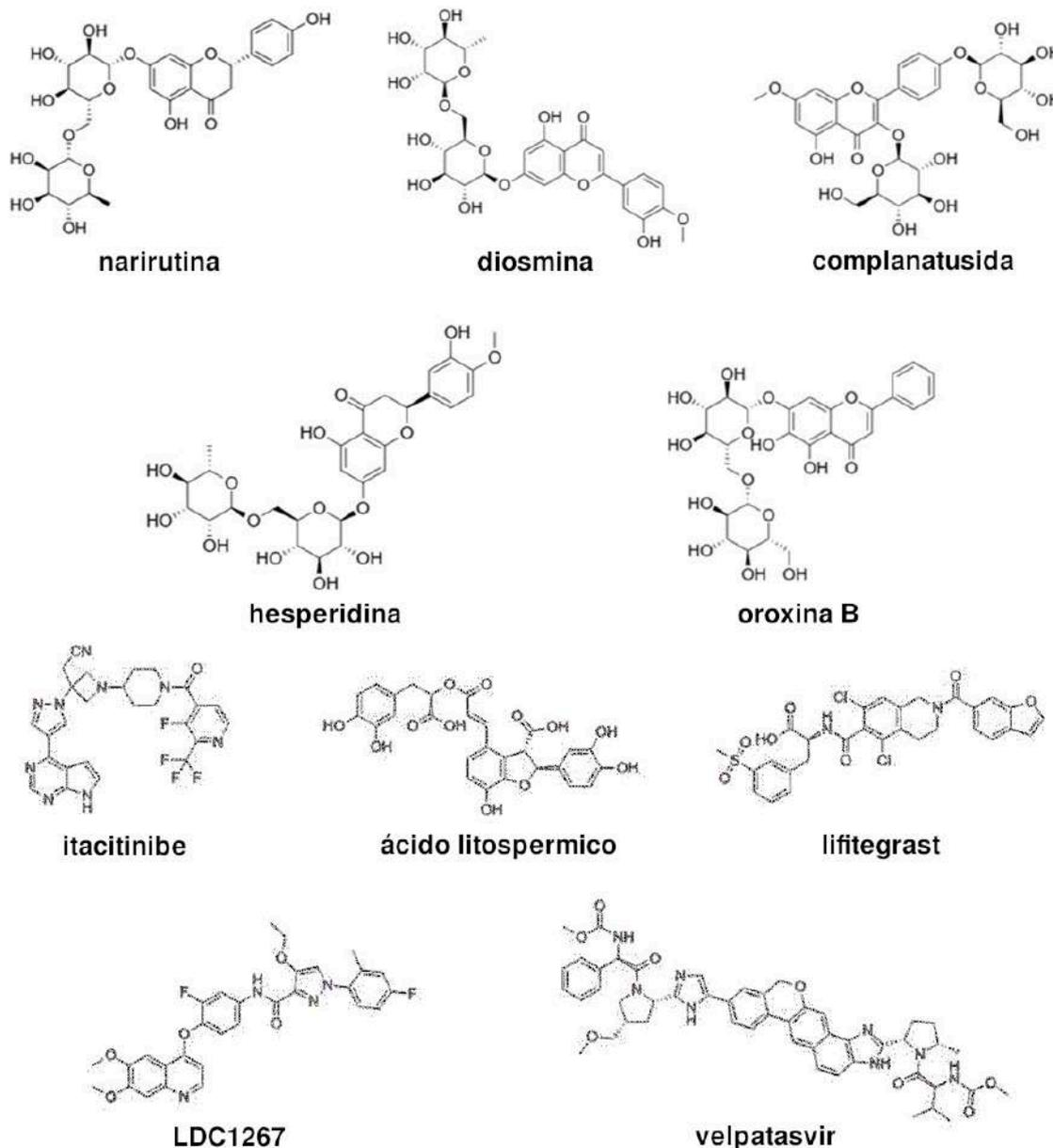


Figura 9. Estruturas químicas dos ligantes selecionados por triagem virtual. As substâncias são narirutina, diosmina, complanatusida, hesperidina, oroxina B, itacitinibe, ácido litospermico, lifitegrast, LDC1267 e velpatasvir.

Dentre os ligantes selecionados, cinco compostos são derivados de flavonoides, entre eles a narirutina, diosmina, complanatusida, hesperidina, oroxina B. No entanto, outros ligantes apresentam estruturas químicas diversas.

Na sequência, o *docking* molecular foi realizado utilizando os dez ligantes encontrados e mais dois ligantes conhecidos do receptor P2X7 (o ativador ATP e o inibidor A740003). O *Rerank score* demonstrou que todos os ligantes têm mais afinidade pelo P2X7R do que o conhecido inibidor altamente seletivo A740003. O *Rerank score* fornecido pelo programa MVD é um critério exclusivo do algoritmo que avalia, além da afinidade do ligante-receptor, a relação de afinidade relativa com outras moléculas no mesmo escopo de análise, sendo o critério mais indicado para análise de ordem classificatória dos ligantes. Os resultados apresentaram pontuações de interação mais favoráveis para as substâncias velpatasvir, ácido litospermico e narirutina. Com exceção da oroxina-B, as dez moléculas apresentaram maior afinidade pelo receptor do que o ligante endógeno ATP e o inibidor A740003, sendo a narirutina o ligante mais destacado entre as moléculas derivadas de flavonoides (Tabela 5).

Tabela 5. 10 ligantes selecionados a partir da triagem virtual e *docking* molecular, A740003 e ATP adicionados para comparação de pontuação.

#	Ligante	<i>Rerank Score</i>	#	Ligante	<i>Rerank Score</i>
1	Velpatasvir	-188,91	7	Diosmina	-157,08
2	Ácido litospermico	-179,08	8	Complanatusida	-144,91
3	Narirutina	-168,60	9	Hesperidina	-143,68
4	Lifitegrast	-166,83	10	Oroxina B	-130,30
5	LDC1267	-165,94	-	A740003	-119,91
6	Itacitinibe	-160,74	-	ATP	-134,21

Nesta etapa, observou-se que os derivados de flavonoides têm alta afinidade pelo P2X7R. Os resultados do *docking* molecular indicam que a narirutina pode interagir com os resíduos Ala91A, Asp92A, Thr94A e Asp92C por

ligações de hidrogênio e com os resíduos Phe293A, Tyr295A, Tyr295C, Phe293C e Phe103C por interações hidrofóbicas (Figura 10C). Já a molécula do velpatasvir apresentou interações com os resíduos Glu73C, Gln116B e Phe95A por ligações de hidrogênio e com os resíduos Tyr295A, Tyr93C, Tyr298B e Phe88C por interações hidrofóbicas (Figura 10A). O ácido litospermico apresentou interações com os resíduos Asp92A e Thr94B por ligações de hidrogênio e com os resíduos Tyr295C e Pro96C por interações hidrofóbicas (Figura 10B).

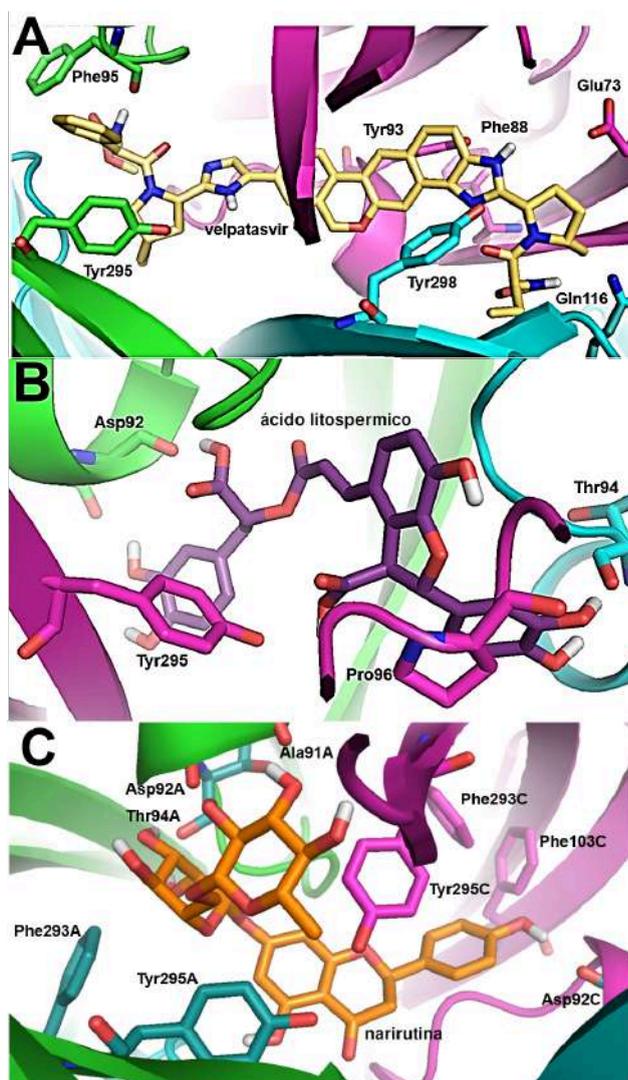


Figura 10. Resultados do *docking* molecular indicando a posição e interações com resíduos do P2X7R. As moléculas são (A) velpatasvir (amarelo), (B) ácido litospermico (roxo) e (C) narirutina (laranja). As letras após o nome do aminoácido representam as subunidades homoméricas do P2X7, sendo, A em verde, B em ciano e C em magenta.

O potencial inibitório de cada um dos dez ligantes promissores foi avaliado *in vitro* e todas as dez substâncias foram comprovadas como inibidoras da função do P2X7R, confirmando as respectivas bioatividades inibitórias. A captação de corante induzida por BzATP em macrófagos peritoneais de camundongos foi inibida por todos os dez ligantes promissores. Esses experimentos foram realizados em triplicata em 3 dias distintos por colaboradores do LAPSA/IOC/Fiocruz (Figura 11).

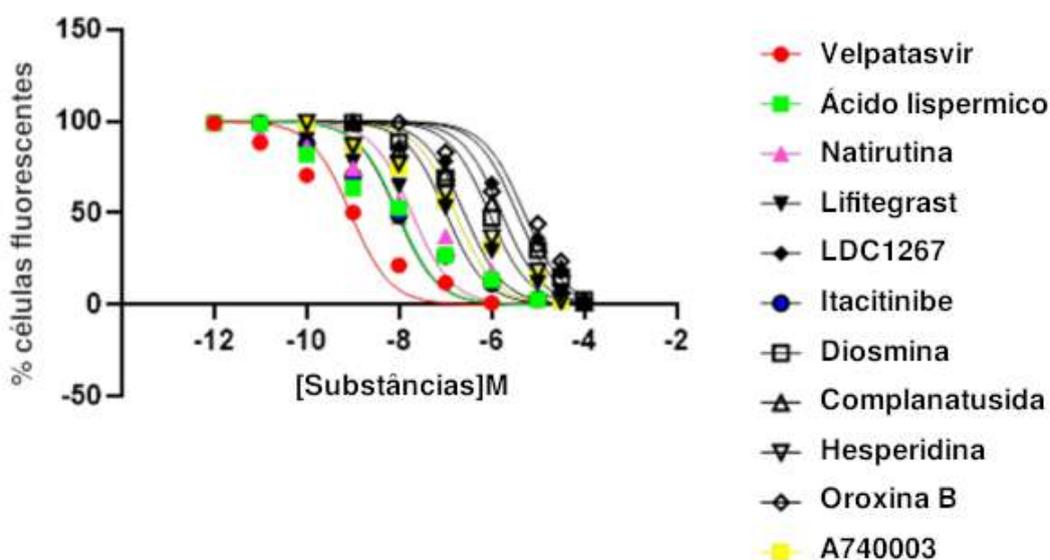


Figura 11. Os ligantes selecionados inibiram a captação de corante induzida por BzATP em macrófagos peritoneais de camundongos. Esses experimentos foram realizados por colaboradores do LAPSA/IOC/Fiocruz.

A maioria das moléculas exibiu valores de IC₅₀ em concentrações de nanomolares: velpatasvir ($0,88 \pm 0,1$ nM), itacitinibe ($8,92 \pm 1,3$ nM), ácido litospermico ($9,5 \pm 0,4$ nM), narirutina ($18,89 \pm 3,2$ nM), lifitegrast ($102,8 \pm 9,6$ nM), hesperidina ($254,8 \pm 15$ nM) e diosmina ($881,4 \pm 77$ nM). O potente inibidor A740003 teve um valor IC₅₀ de $164,0 \pm 12,0$ nM, reduzindo pela metade a escolha de moléculas promissoras com doses superiores a ele (Tabela 6). Sendo assim, para uma análise mais detalhada do comportamento das moléculas, foram selecionadas as quatro mais potentes.

Tabela 6. Atividade inibitória dos ligantes testados *in vitro* no P2X7R de camundongo.

#	Ligante	IC50 (nM)
1	Velpatasvir	0,88 ± 0,1
2	Itacitinibe	8,92 ± 1,3
3	Ácido litospermico	9,5 ± 0,4
4	Narirutina	18,89 ± 3,2
5	Lifitegrast	102,8 ± 9,6
-	A740003	164,0 ± 12,0
6	Hesperidina	254,8 ± 15,0
7	Diosmina	881,4 ± 77,0
8	Complanatusida	1.640,0 ± 300,0
9	LDC1267	3.540,0 ± 900,0
10	Oroxina B	5.090,0 ± 1.100,0

4.1.3 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

Foi realizada a geração de quatro sistemas distintos contendo cada um deles os ligantes velpatasvir, itacitinibe, ácido litospermico, narirutina, assim como todas condições ideais para a DM (Figura 12). As posições dos complexos ligante-receptor foram obtidas do resultado do *docking* molecular, e cada sistema foi submetido a 100 ns em DM para análise detalhada do comportamento molecular em relação ao tempo. Por serem os mais potentes identificados nos testes de afinidade *in vitro*, buscou-se informações de interesse a nível atômico de interações com os resíduos de aminoácidos do P2X7R.

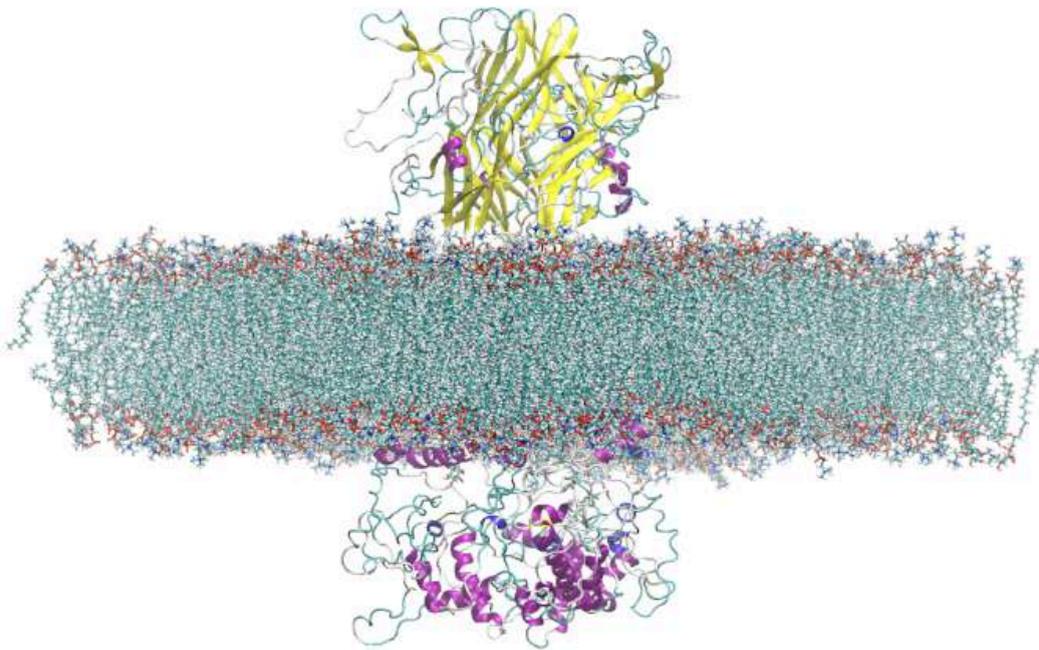


Figura 12. Sistema contendo um ligante e P2X7R inserido na bicamada fosfolipídica para DM, sem as moléculas de água e íons para visualização do sistema.

As análises das quatro trajetórias foram feitas por meio dos cálculos de RMSF, RMSD (Figura 12) e MM-PBSA (Tabela 5). O RMSF mostrou o movimento do P2X7R em cada sistema, com os picos observados indicando áreas envolvidas nas mudanças conformacionais. O complexo velpatasvir-receptor apresentou uma flutuação média mais elevada na atividade da proteína em comparação com os outros. Por outro lado, o complexo itacitinibe-receptor manteve maior estabilidade (Figura 13A). Os ligantes, em geral, apresentaram uma alta estabilidade ao longo da DM, como demonstrado no RMSD e permaneceram no mesmo local de ligação. Após os 75 ns os ligantes, exceto itacitinibe, apresentam uma oscilação mais significativa, mas não excedendo a amplitude de 1,5 Å (Figura 13B). O RMSD da proteína sugere que a estabilidade estrutural ocorreu na primeira metade da trajetória (Figura 13C).

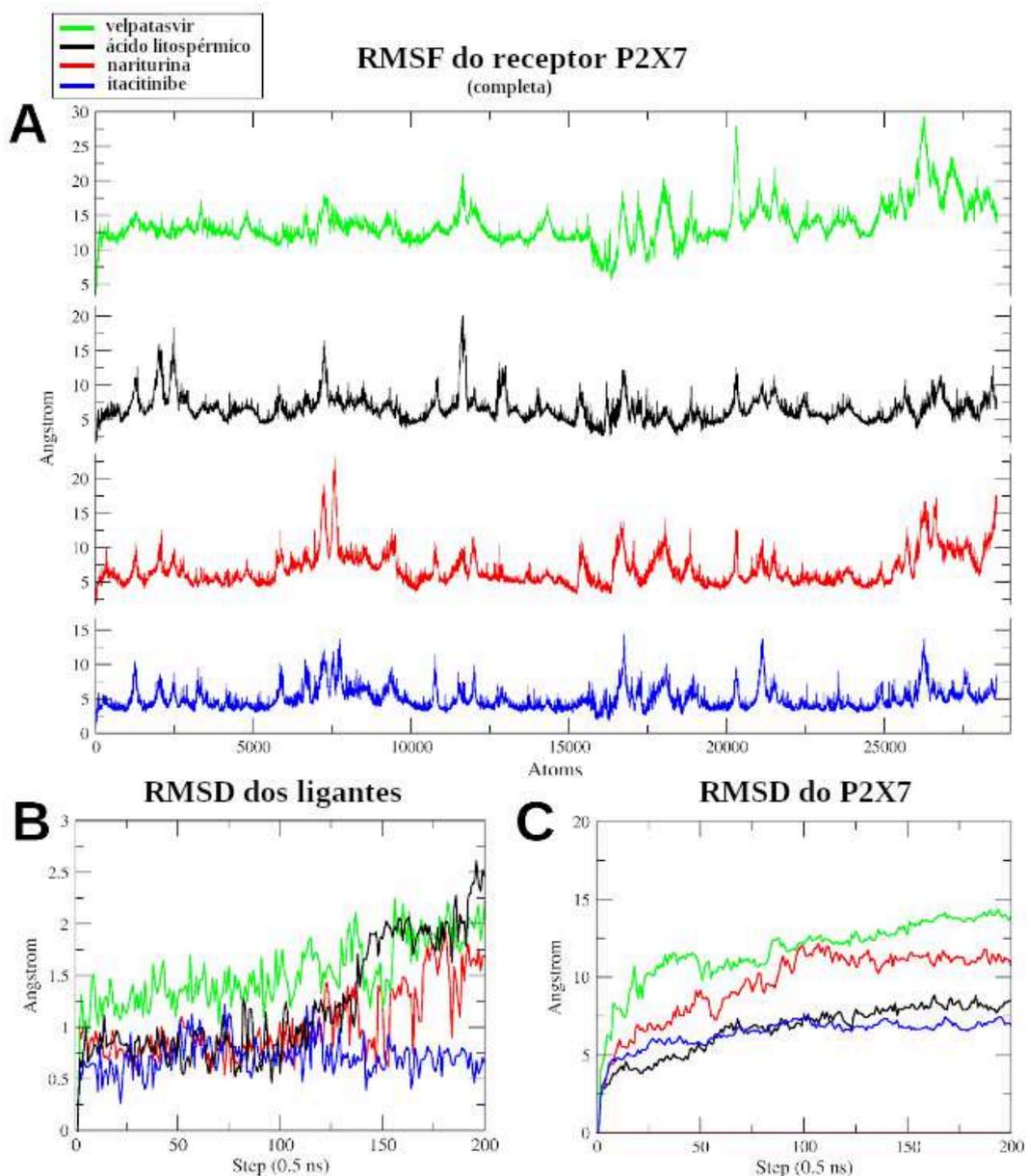


Figura 13. Análise da trajetória dinâmica molecular de P2X7 ligado aos seus respectivos ligantes. (A) RMSF do receptor completo, (B) RMSD dos ligantes, (C) RMSD da proteína.

Os cálculos de energia livre de ligação foram realizados nos últimos 5 ns das trajetórias das DM, a fim de avaliar quantitativamente as diferenças na afinidade entre os ligantes. Os resultados podem ser encontrados na Tabela 7, mas, de forma geral, houve a confirmação do velpatasvir com maior afinidade de ligação ($-86,7491 \pm 4,1155$ Kcal/mol).

Tabela 7. Cálculo de energia livre de ligação dos ligantes mais promissores realizado durante os últimos 5 ns da trajetória de DM através do método MM-PBSA.

#	Ligante	Energia livre de ligação (Kcal/mol)
1	Velpatasvir	-86,7491 ± 4,1155
2	Itacitinibe	-64,3956 ± 2,0766
3	Narirutina	-63,3815 ± 3,1479
4	Ácido litospermico	-62,6523 ± 2,9332

Após a trajetória de 100 ns dos quatro complexos, foram extraídas as posições finais para análise de interações dos resíduos de aminoácidos de cada complexo. As poses, quando comparadas com as poses dos ligantes obtidas no *docking* molecular, apresentaram similaridade de interação com os mesmos resíduos apresentados anteriormente (Figuras 14 a 17).

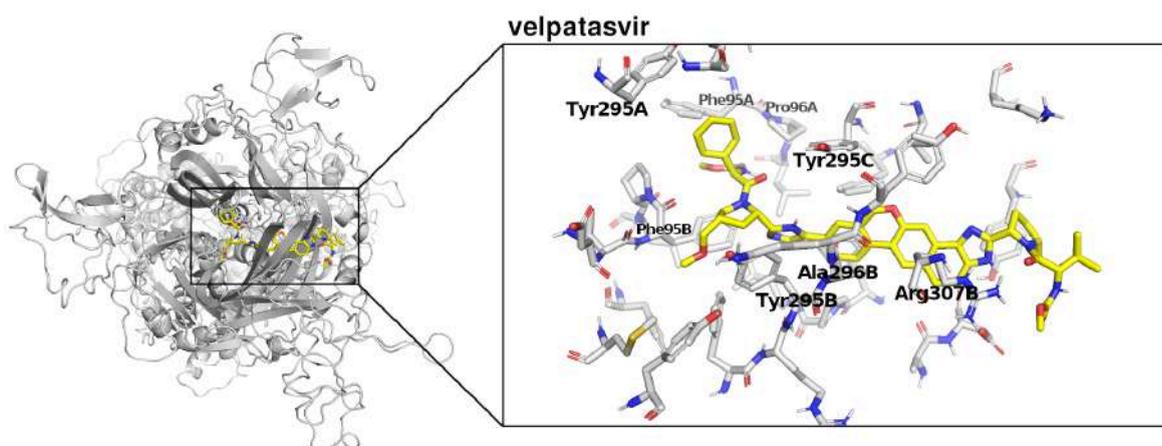


Figura 14. Pose final do velpatasvir após 100 ns de trajetória.

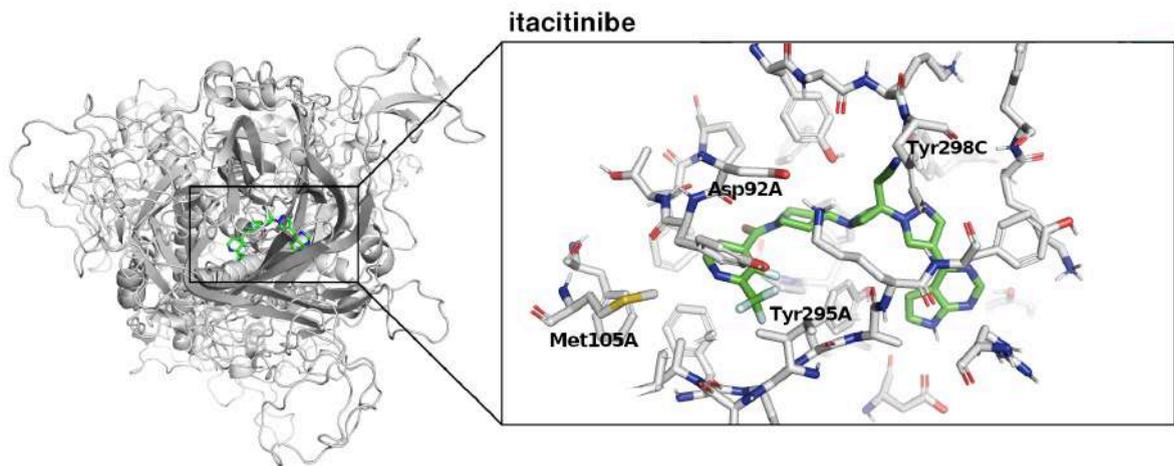


Figura 15. Pose final do itacitinibe após 100 ns de trajetória.

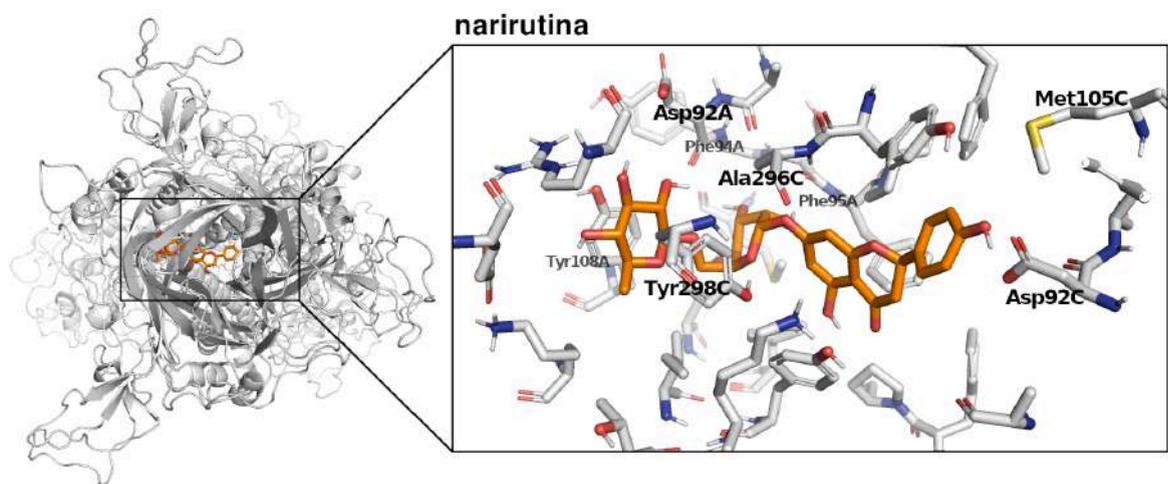


Figura 16. Pose final da narirutina após 100 ns de trajetória.

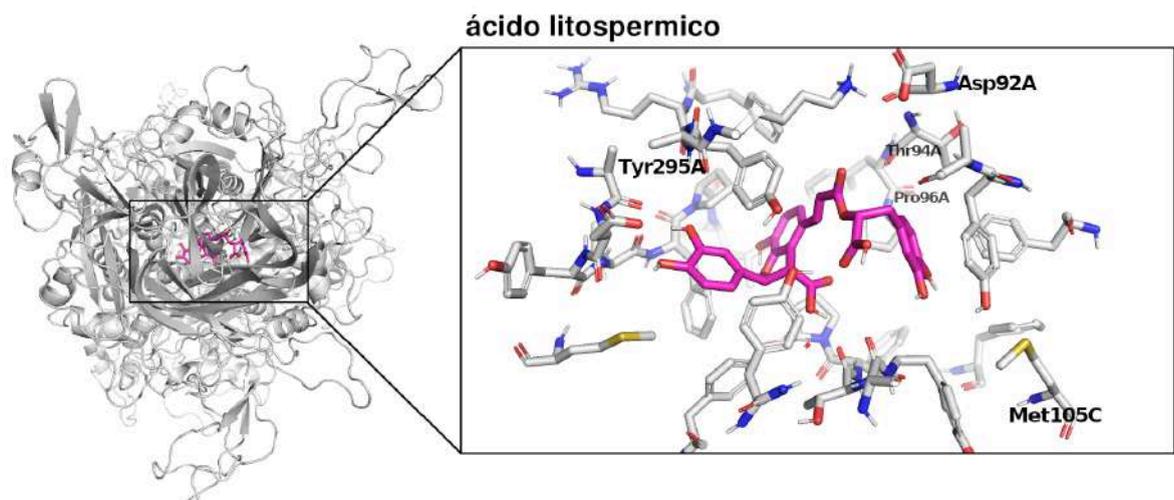


Figura 17. Pose final do ácido litospermico após 100 ns de trajetória.

O sítio de ligação mais provável dos quatro ligantes promissores estaria localizado mais próximo ao poro do canal P2X7 (Figura 18). E conforme foi detectado através do RMSD dos ligantes, o comportamento das moléculas se manteve estável na região, interagindo no mínimo com duas subunidades da proteína com uma parte projetada para o poro.

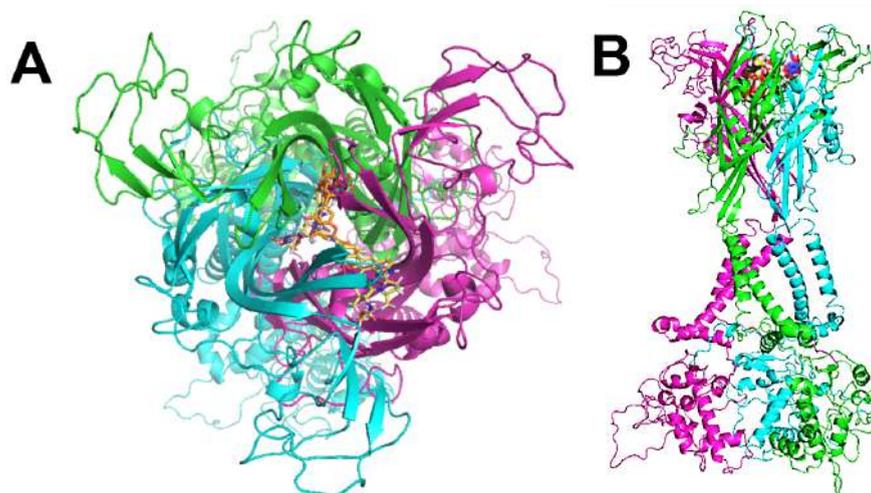


Figura 18. O sítio de ligação dos quatro ligantes promissores (velpatasvir, itacitinibe, ácido litospermico e narirutina) no P2X7R. Alvo molecular em (A) vista superior e (B) vista lateral.

4.2 PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS

4.2.1 TRIAGEM DE COMPLEMENTARIDADE

A triagem dos potenciais coformadores de cocristais começa com a otimização da biblioteca de 107 moléculas consideradas seguras para consumo (Figura 19).

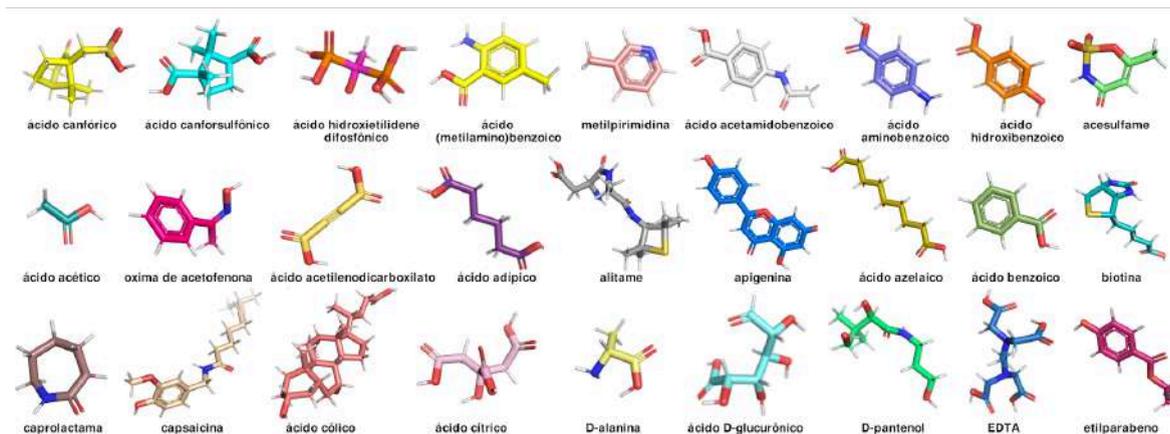


Figura 19. Representação conformacional de 27 dos 107 coformadores após otimização geométrica.

Em seguida, foram calculadas as taxas de acerto das 107 moléculas promissoras para cocristalização para cada uma das 4 moléculas candidatas, o velpatasvir (Tabela 8), o itacitinibe (Tabela 9), a narirutina (Tabela 10), o ácido litospermico (Tabela 11). A escala da taxa de acerto (*Hit Rate*) varia em $\pm 1\%$ devido às 100 conformações geradas inicialmente de cada molécula, sendo 100% a complementaridade com as 100 conformações. No entanto, o algoritmo é eficiente em definir quais coformadores são improváveis, pois a taxa de acerto igual a zero indica o descarte das análises subsequentes de determinados coformadores.

O velpatasvir demonstrou ter pouca afinidade com a biblioteca de coformadores nessa etapa da análise qualitativa. A maioria das moléculas coformadoras deram zero no resultado da taxa de acerto (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado da análise qualitativa (*Hit Rate* %) dos coformadores com o velpatasvir que obtiveram taxa de acerto maior que zero.

Ácido fólico	48
Ácido lactobiônico	46
Alitame	27
EDTA	5
Hesperetina	5
Capsaicina	4
Ácido cólico	4
D-pantotenol	2

Tabela 9. Resultado da análise qualitativa (*Hit Rate* %) dos coformadores com o itacitinibe que obtiveram taxa de acerto maior que zero.

Ácido fólico	100	L-glutamina	31	Ácido salicílico	8
D-pantotenol	100	Ácido pamoico	28	Cafeína	7
Ácido lactobiônico	99	Ácido L-glutâmico-Z	27	Ácido	
Lactose	99	Ácido D-glicurônico	25	2,5-dihidroxibenzoico	7
Capsaicina	96	Etilparabeno	23	Teofilina	6
Ácido cólico	96	Ácido pimélico	22	Acessulfame	5
Ácido hipúrico	95	Maltitol	19	Caprolactona	5
Alitame	92	Etil maltol	18	Valerolactona	5
Biotina	92	L-leucina	17	Apigenina	1
t-Butil-hidroxianisol	87	Manitol	16	Ácido	
L-fenilalanina	72	D-prolina	16	6-hidroxi-2-naftoico	1
EDTA	70	Isonicotinamida	16	Ácido gentísico	1
L-triptofano	66	Ftalimida	13	Ácido	
L-tirosina	66	Ácido adípico	11	acetilenodicarboxílico	1
Ácido L-mandélico	64	Ácido (-)-cânforsulfônico	11	L-prolina	1
Ácido (+)-cânforico	60	Nicotinamida	11	Ácido maleico	1
L-glutationa	56	Ácido etanossulfônico	11	Ácido 4-aminobenzoico	1
Ácido hidroxicinâmico	56	Ácido azelaico	10	Ácido	
Hesperetina	53	Ácido subérico	10	pirazina-2-carboxílico	1
Ácido L-glutâmico	53	Ácido cetoglutárico	10	Ácido fumárico	
Monobutirina	50	Ácido 3-hidroxi-2-naftoico	10	Ácido 4-hidroxibenzoico	1
Ácido L-piroglutâmico	45	Ácido		Ácido benzoico	1
L-arginine	40	4-acetamidobenzoico	10	Ácido nicotínico	1
Ácido L-pipecólico	40	Ácido glutárico	10	Imidazol	1
Ácido cítrico	38	Ácido sórbico	10	Pirazol	1
Ácido D-pipecólico	37	Ácido succínico	10	Piperazina	1
L-metionina	36	Metilparabeno	10	Pirazina	1
Propilparabeno	32	N-etilacetamida	10	Riboflavina	1
Ácido		Sacarina	9		
p-toluenossulfônico	32	Ácido			
Ácido		2-amino-5-metilbenzoico	9		
benzenossulfônico	32	Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	9		
Oxima de		3-metilpiridina	9		
acetofenona	32				

Tabela 10. Resultado da análise qualitativa (*Hit Rate* %) dos coformadores com o narirutina que obtiveram taxa de acerto maior que zero.

Ácido lactobiônico	80	Capsaicina	33	Ácido	15
Lactose	80	Ácido málico	33	2,5-dihidroxibenzoico	
Alitame	80	Ácido benzenossulfônico	33	L-prolina	15
EDTA	79	Oxima de acetofenona	33	Glicina	14
Ácido pamoico	77	Ácido L-glutâmico-Z	32	Ácido cetoglutárico	13
Hesperetina	74	Etil maltol	31	Ácido	
Ácido fólico	72	Ftalamida	30	4-acetamidobenzoico	13
L-glutationa	69	Sacarina	29	Ácido glutárico	13
Maltitol	65	L-leucina	28	Ácido sórbico	13
t-Butil-hidroxianisol	65	Isonicotinamida	28	Ácido succínico	13
D-pantotenol	64	Ácido L-aspártico-Z	27	Ácido malônico	11
Biotina	63	Propilparabeno	25	Ácido glicólico	11
Ácido (+)-cânforico	57	Ácido L-aspártico	24	Apigenina	7
L-triptofano	56	D-prolina	24	Ácido	
L-tirosina	52	Etilparabeno	23	6-hidroxi-2-naftoico	7
Ácido hipúrico	51	Acessulfame	23	Ácido gentísico	7
Ácido trifenilacético	48	Ácido pimélico	22	Ácido	
Ácido cítrico	47	Nicotinamida	20	acetilnodicarboxílico	7
L-fenilalanina	47	Teofilina	18	Ácido 4-aminobenzoico	7
Monobutirina	46	N-etilacetamida	18	Ácido 4-hidroxibenzoico	7
Ácido L-glutâmico	45	3-metilpiridina	18	Ácido	
Ácido cólico	44	Ácido etanossulfônico	18	pirazina-2-carboxílico	7
Ácido D-glicurônico	44	L-arginina	17	Ácido maleico	7
Ácido hidroxicinâmico	42	Cafeína	17	Ácido fumárico	7
Ácido L-mandélico	42	Metilparabeno	17	Ácido benzoico	7
Ácido		Caprolactona	17	Ácido nicotínico	7
(-)-cânforsulfônico	42	Ácido 3-hidroxi-2-naftoico	16	Pirazina	7
L-metionina	40	Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	16	L-serina	6
Ácido L-pipecólico	39	Ácido adípico	16	Piperazina	6
L-glutamina	36	Ácido		Imidazol	5
Ácido L-tartárico	36	2-amino-5-metilbenzoico	16	Ácido L-láctico	4
Ácido L-piroglutâmico	36	Ácido salicílico	16	Ácido acético	4
Ácido D-pipecólico	36	Valerolactona	16	D-alanina	3
Mannitol	34	Ácido azelaico	15	Xantina	2
Ácido		Ácido subérico	15	Pirazol	2
p-toluenossulfônico	34				

Tabela 11. Resultado da análise qualitativa (*Hit Rate* %) dos coformadores com o ácido litospermico que obtiveram taxa de acerto maior que zero.

Ácido lactobiônico	98	Ácido trifenilacético	38	Acessulfame	8
Hesperetina	98	Ácido hidroxicinâmico	35	Ácido L-pipecólico	8
Alitame	97	L-fenilalanina	34	Caprolactona	7
EDTA	80	Manitol	32	L-metionina	6
D-pantotenol	75	L-leucina	29	Ácido D-pipecólico	6
Lactose	73	L-triptofano	26	Propilparabeno	5
Ácido cólico	67	L-tirosina	24	Ácido málico	5
Ácido fólico	62	Ácido L-aspártico-Z	24	Ácido p-toluenossulfônico	5
Ácido hipúrico	62	Ácido L-mandélico	23	Ácido benzenossulfônico	5
Maltitol	60	D-prolina	21	Oxima de acetofenona	5
Biotina	59	Ácido L-tartárico	19	Ácido etanossulfônico	5
Capsaicina	57	Ácido L-glutâmico	19	Valerolactona	5
Ácido cítrico	50	Ácido L-piroglutâmico	19	Ácido L-glutâmico-Z	3
Ácido D-glicurônico	49	Monobutirina	15	Etil maltol	3
Ácido (-)-cânforsulfônico	49	Ftalamida	14	Ácido pimélico	2
t-Butil-hidroxianisol	45	L-arginina	13	Etilparabeno	2
Ácido (+)-cânforico	45	Sacarina	11	Ácido malônico	2
Ácido pamoico	43	L-prolina	11	Isonicotinamida	2
L-glutationa	40	Ácido L-aspártico	10		
		L-glutamina	9		

As moléculas candidatas também foram avaliadas entre elas e observou-se uma indicação favorável de afinidade caso elas fossem utilizadas para testes de recristalização entre si (Tabela 12). No entanto, essa etapa possui muitas limitações que exigem subsequente avaliação, como a informação quantitativa de energia, os dados estequiométricos e os grupos de simetrias das unidades cristalinas desses complexos.

Tabela 12. Análise qualitativa (*Hit Rate* %) entre as moléculas bioativas selecionadas.

Velpatasvir		Itacitinibe		Narirutina		Ác. litospermico	
Ác. litospermico	89	Ác. litospermico	100	Ác. litospermico	100	Narirutina	85
Narirutina	82	Velpatasvir	99	Velpatasvir	40	Velpatasvir	62
Itacitinibe	52	Narirutina	85	Itacitinibe	11	Itacitinibe	59

4.2.2 DOCKING MOLECULAR DE FÁRMACO E COFORMADOR

Após a análise qualitativa de complementaridade, o programa Molegro foi utilizado para análise quantitativa das 107 moléculas coformadoras, juntamente com os próprios ligantes selecionados. Sendo assim, pode-se definir em forma de pontuação (*ranking*) os resultados de moléculas mais promissoras.

Embora o *docking* molecular tenha seu uso conhecido para ligantes e proteínas, as interações entre fármaco e coformadores se assemelham a este uso devido aos cálculos de energia e distâncias topológicas entre os átomos das duas estruturas. Nesta etapa, cada coformador foi verificado exaustivamente em milhares de posições com cada candidato para criar um ranking de moléculas que poderiam gerar um cocristal, através da energia do complexo mais favorável. Os ligantes promissores foram avaliados entre si e considerada apenas a proporção de uma molécula do fármaco para uma de coformador (1 fármaco : 1 coformador), nessa etapa pode-se agrupar a taxa de acerto e energia de interação (Tabela 13 a 16).

Tabela 13. *Ranking* de energias de interação dos 15 primeiros complexos do velpatasvir, (*) também foi avaliada a energia de interação da própria molécula como sendo um coformador.

<i>Ranking</i>	Mercury	Molegro Virtual Docker
Complexo avaliado	<i>Taxa de acerto (%)</i>	<i>Moldock Score</i>
1° (*) 1 Velpatasvir : 1 <u>Velpatasvir</u>	-	-217,849
2° 1 Velpatasvir : 1 <u>Ác. litospermico</u>	89	-152,084
3° 1 Velpatasvir : 1 <u>Narirutina</u>	82	-148,810
4° 1 Velpatasvir : 1 <u>Ác. fólico</u>	48	-118,699
5° 1 Velpatasvir : 1 <u>Ác. lactobiônico</u>	46	-117,535
6° 1 Velpatasvir : 1 <u>Itacitinibe</u>	52	-113,214
7° 1 Velpatasvir : 1 <u>Maltitol</u>	0	-109,322
8° 1 Velpatasvir : 1 <u>Lactose</u>	0	-108,919
9° 1 Velpatasvir : 1 <u>Riboflavina</u>	0	-106,121
10° 1 Velpatasvir : 1 <u>EDTA</u>	5	-102,378
11° 1 Velpatasvir : 1 <u>L-glutationa</u>	0	-100,673
12° 1 Velpatasvir : 1 <u>Capsaicina</u>	4	-96,676
13° 1 Velpatasvir : 1 <u>Alitame</u>	27	-96,258
14° 1 Velpatasvir : 1 <u>Ác. Pamoico</u>	0	-88,405
15° 1 Velpatasvir : 1 <u>Ác. Cólico</u>	4	-82,517

Tabela 14. *Ranking* de energias de interação dos 15 primeiros complexos do itacitinibe, (*) também foi avaliada a energia de interação da própria molécula como sendo um coformador.

<i>Ranking</i>	Mercury	Molegro Virtual Docker
Complexo avaliado	<i>Taxa de acerto (%)</i>	<i>Moldock Score</i>
1° 1 Itacitinibe : 1 <u>Velpatasvir</u>	96	-168,104
2° 1 Itacitinibe : 1 <u>Ác. litospermico</u>	100	-151,809
3° 1 Itacitinibe : 1 <u>Narirutina</u>	85	-136,961
4° 1 Itacitinibe : 1 <u>Ác. lactobiônico</u>	99	-120,872
5° 1 Itacitinibe : 1 <u>Ác. fólico</u>	100	-109,026
6° 1 Itacitinibe : 1 EDTA	70	-106,841
7° 1 Itacitinibe : 1 Maltitol	19	-106,452
8° 1 Itacitinibe : 1 L-glutaciona	56	-105,705
9° 1 Itacitinibe : 1 Lactose	99	-102,078
10° (*) 1 Itacitinibe : 1 <u>Itacitinibe</u>	-	-98,600
11° 1 Itacitinibe : 1 Riboflavina	0	-95,414
12° 1 Itacitinibe : 1 Alitame	92	-95,395
13° 1 Itacitinibe : 1 Capsaicina	96	-89,001
14° 1 Itacitinibe : 1 <u>Ác. pamoico</u>	28	-88,063
15° 1 Itacitinibe : 1 <u>Ác. D-glucoriônico</u>	25	-78,871

Tabela 15. *Ranking* de energias de interação dos 15 primeiros complexos do narirutina, (*) também foi avaliada a energia de interação da própria molécula como sendo um coformador.

<i>Ranking</i>		Mercury	Molegro Virtual Docker
Complexo avaliado		<i>Hit Rate (%)</i>	<i>Moldock Score</i>
1°	1 Narirutina : 1 <u>Velpatasvir</u>	40	-190,922
2°	1 Narirutina : 1 <u>Ác. litospermico</u>	99	-159,403
3°	(*) 1 Narirutina : 1 <u>Narirutina</u>	-	-152,127
4°	1 Narirutina : 1 <u>Ác. fólico</u>	72	-128,789
5°	1 Narirutina : 1 <u>Ác. lactobiônico</u>	80	-128,083
6°	1 Narirutina : 1 <u>Maltitol</u>	65	-124,026
7°	1 Narirutina : 1 <u>Riboflavina</u>	0	-120,230
8°	1 Narirutina : 1 <u>L-glutationa</u>	69	-119,030
9°	1 Narirutina : 1 <u>Lactose</u>	80	-118,786
10°	1 Narirutina : 1 <u>EDTA</u>	79	-113,884
11°	1 Narirutina : 1 <u>Ác. pamoico</u>	77	-113,343
12°	1 Narirutina : 1 <u>Capsaicina</u>	33	-110,786
13°	1 Narirutina : 1 <u>Alitame</u>	80	-109,503
14°	1 Narirutina : 1 <u>Itacitinibe</u>	11	-107,750
15°	1 Narirutina : 1 <u>Hesperitina</u>	74	-99,913

Tabela 16. *Ranking* de energias de interação dos 15 primeiros complexos do ácido litospermico, (*) também foi avaliada a energia de interação da própria molécula como sendo um coformador.

<i>Ranking</i>		Mercury	Molegro Virtual Docker
	Complexo avaliado	<i>Hit Rate (%)</i>	<i>Moldock Score</i>
1°	1 Ác. litospermico : 1 <u>Velpatasvir</u>	62	-181,394
2°	(*) 1 Ác. litospermico : 1 <u>Ác. litospermico</u>	-	-151,961
3°	1 Ác. litospermico : 1 <u>Narirutina</u>	97	-144,575
4°	1 Ác. litospermico : 1 <u>Itacitinibe</u>	59	-127,087
5°	1 Ác. litospermico : 1 Ác. lactobiônico	98	-119,533
6°	1 Ác. litospermico : 1 Maltitol	60	-117,747
7°	1 Ác. litospermico : 1 Ác. fólico	62	-115,307
8°	1 Ác. litospermico : 1 L-glutaciona	40	-109,391
9°	1 Ác. litospermico : 1 Lactose	73	-107,946
10°	1 Ác. litospermico : 1 EDTA	80	-105,552
11°	1 Ác. litospermico : 1 Riboflavina	0	-101,284
12°	1 Ác. litospermico : 1 Capsaicina	57	-99,492
13°	1 Ác. litospermico : 1 Alitame	97	-98,423
14°	1 Ác. litospermico : 1 Ác. cólico	67	-91,451
15°	1 Ác. litospermico : 1 Ác. pamoico	43	-90,511

Apesar do relativo baixo custo computacional dessa etapa, a análise tem somente o propósito de direcionamento, pois o estudo de estruturas cristalinas requer uma estratégia de investigação de sistemas cristalinos que leva em consideração os cálculos de simetrias imprescindíveis para a formação de um cristal. Portanto, as análises até o momento podem indicar coformadores potenciais para um estudo mais rigoroso em algoritmos de cálculos quânticos de predição de estrutura cristalina de elevado custo computacional.

4.2.3 COMPLEXOS ELEGÍVEIS PARA CÁLCULOS AVANÇADOS

Os complexos fármaco-coformador avaliados através das análises qualitativas (triagem por complementaridade) e quantitativas (*MolDock Score*) se demonstraram favoráveis quando o conformador é pertencente ao grupo de moléculas selecionadas, com exceção do itacitinibe que apresentou outras moléculas como potencial conformadoras, como o ácido lactobiônico na posição 4 do *ranking* (Tabela 17). A narirutina e o ácido litospermico apresentaram o velpatasvir como conformador de interesse mais apropriado que a própria molécula. O velpatasvir teve maior afinidade com a própria molécula, porém também teve uma ótima afinidade com as outras duas moléculas de produtos naturais.

Tabela 17. *Ranking* resumido dos complexos para cada um dos candidatos a formação de cocrystal.

Velpatasvir	Itacitinibe	Narirutina	Ác. litospermico
1. Velpatasvir	1. Velpatasvir	1. Velpatasvir	1. Velpatasvir
2. Ác. litospermico	2. Ác. litospermico	2. Ác. litospermico	2. Ác. litospermico
3. Narirutina	3. Narirutina	3. Narirutina	3. Narirutina
4. Ác. fólico	4. Ác. lactobiônico	4. Ác. Fólico	4. Itacitinibe
6. Itacitinibe	10. Itacitinibe		

O valor de pontuação fornecido pelo programa MVD é uma síntese das interações intermoleculares não-covalentes, na qual envolve interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações π e efeitos hidrofóbicos. Sendo assim, ao analisar as moléculas dos conformadores em suas posições tridimensionais nos complexos, torna-se mais observável a variação dos valores de energia. O velpatasvir faz interações π - π mais favoráveis com o ácido litospermico (Figura 20), enquanto o itacitinibe interage através das ligações hidrogênio com o ácido lactobiônico (Figura 21).

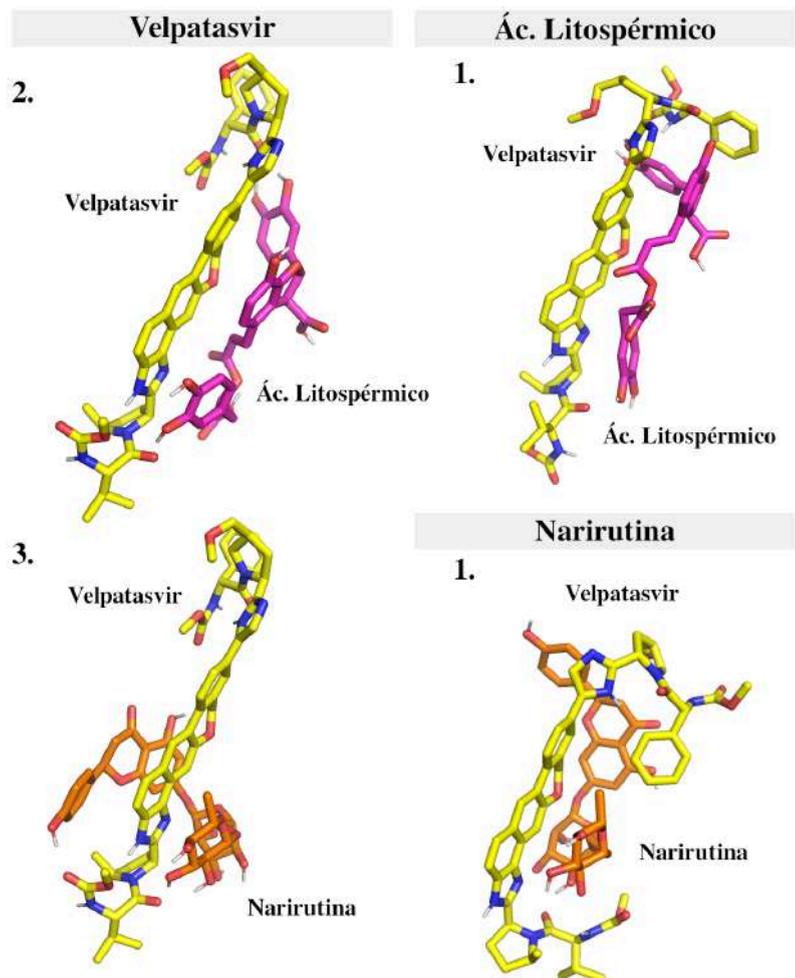


Figura 20. Complexos favoráveis do velpatasvir com os dois produtos naturais, ácido litospérmico e narirutina.

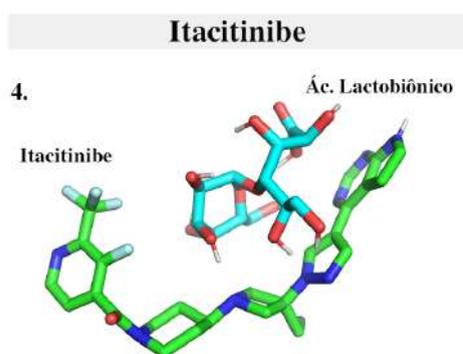


Figura 21. Complexo favorável do itacitinibe com o ácido lactobiônico.

4.2.4 CÁLCULOS DE PROPORÇÃO E SIMETRIA

Para essa etapa, foram escolhidos o fármaco velpatasvir e o produto natural ácido litospermico, pois ambos estão entre as quatro moléculas bioativas com maior afinidade e por apresentarem boa correlação para formação de cocristais, contribuindo, assim, para a produção de um produto com dupla ação. Com isso, a avaliação de proporção estequiométrica e de simetria da célula cristalina foi realizada entre milhares de possibilidades, resultando em 10 complexos cristalinos distintos (Tabela 18).

Tabela 18. Sistemas cristalinos estáveis para velpatasvir (VEL) e ácido litospermico (LIT).

ID do cocrystal	Estequiometria VEL:LIT (Razão)	Átomos por célula unitária	Entalpia de formação (eV)	Volume (Å ³)	Simetria (n° grupo)
VL1	3:3 (1:1)	540	-71474,73	10143,25	P3 ₁ (#144)
VL2	1:1 (1:1)	180	-23824,96	2811,52	P1 (#1)
VL3	2:2 (1:1)	360	-47651,90	6576,60	P21 (#4)
VL4	9:9 (1:1)	540	-71479,34	13837,51	R3 (#146)
VL5	3:3 (1:1)	540	-71485,06	10267,89	P3 ₁ (#144)
VL6	9:9 (1:1)	540	-71486,87	11266,16	R3 (#146)
VL7	4:4 (1:1)	360	-47658,37	8106,20	C2 (#5)
VL8	3:3 (1:1)	540	-71489,12	11256,95	P3 ₂ (#145)
VL9	1:1 (1:1)	180	-23829,98	3071,13	P1 (#1)
VL10	2:2 (1:1)	360	-47660,16	8356,16	P21 (#4)

Em geral, a proporção encontrada foi de 1:1 com uma baixa diversidade de simetria. Nesta etapa, as duas moléculas formaram uma tendência de estruturas, em que vistas pelo o eixo C, o ângulo difere de 90°, sendo elas as VL1, VL4, VL5, VL6 e VL8, com as moléculas formando estruturas triangulares (Figura 22 e 23).

Velpatasvir e Ácido litospérmico

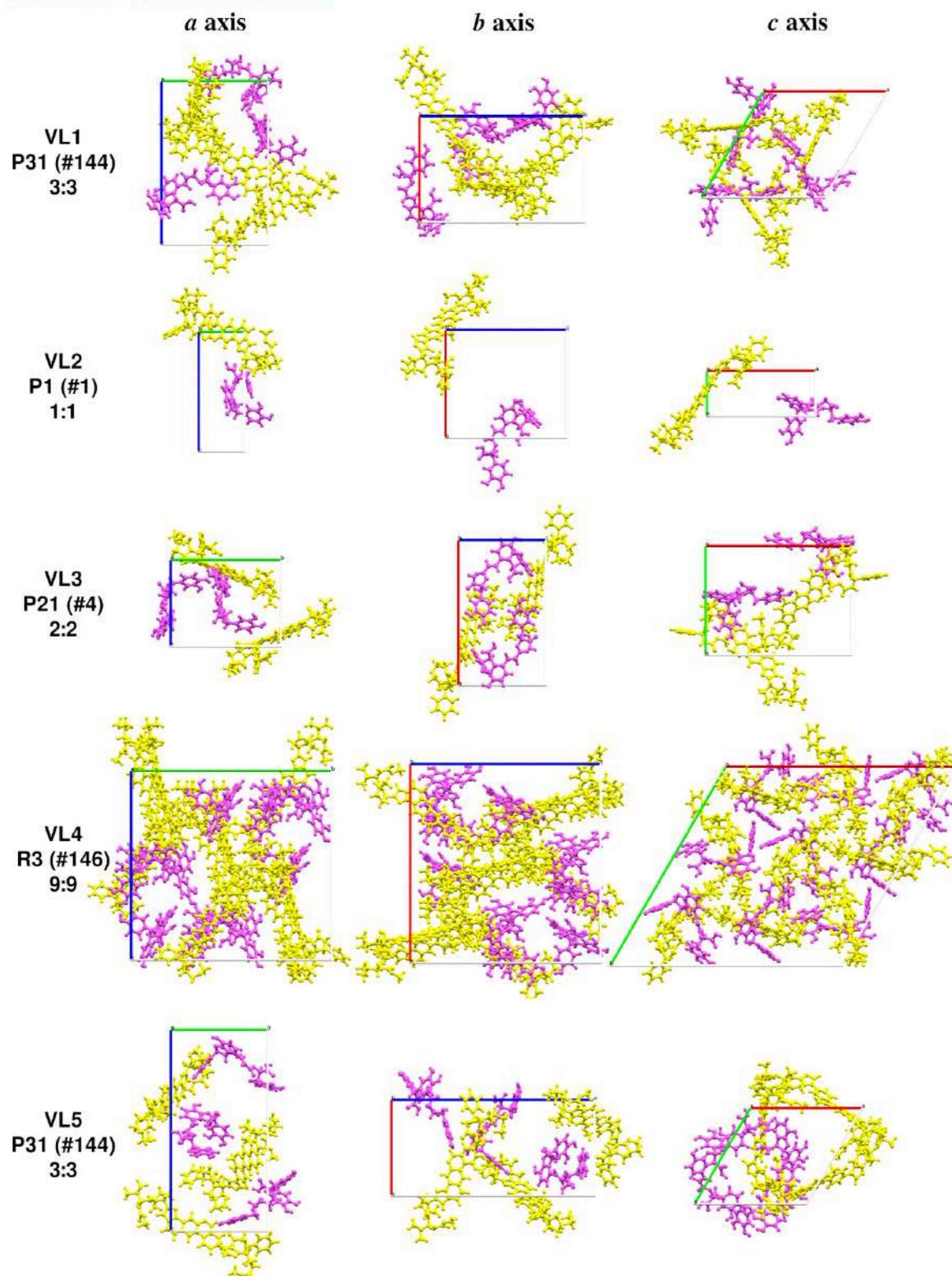


Figura 22. Estruturas 1 a 5 selecionadas de velpatasvir (amarelo) e ácido litospérmico (rosa).

Velpatasvir e Ácido litospémico

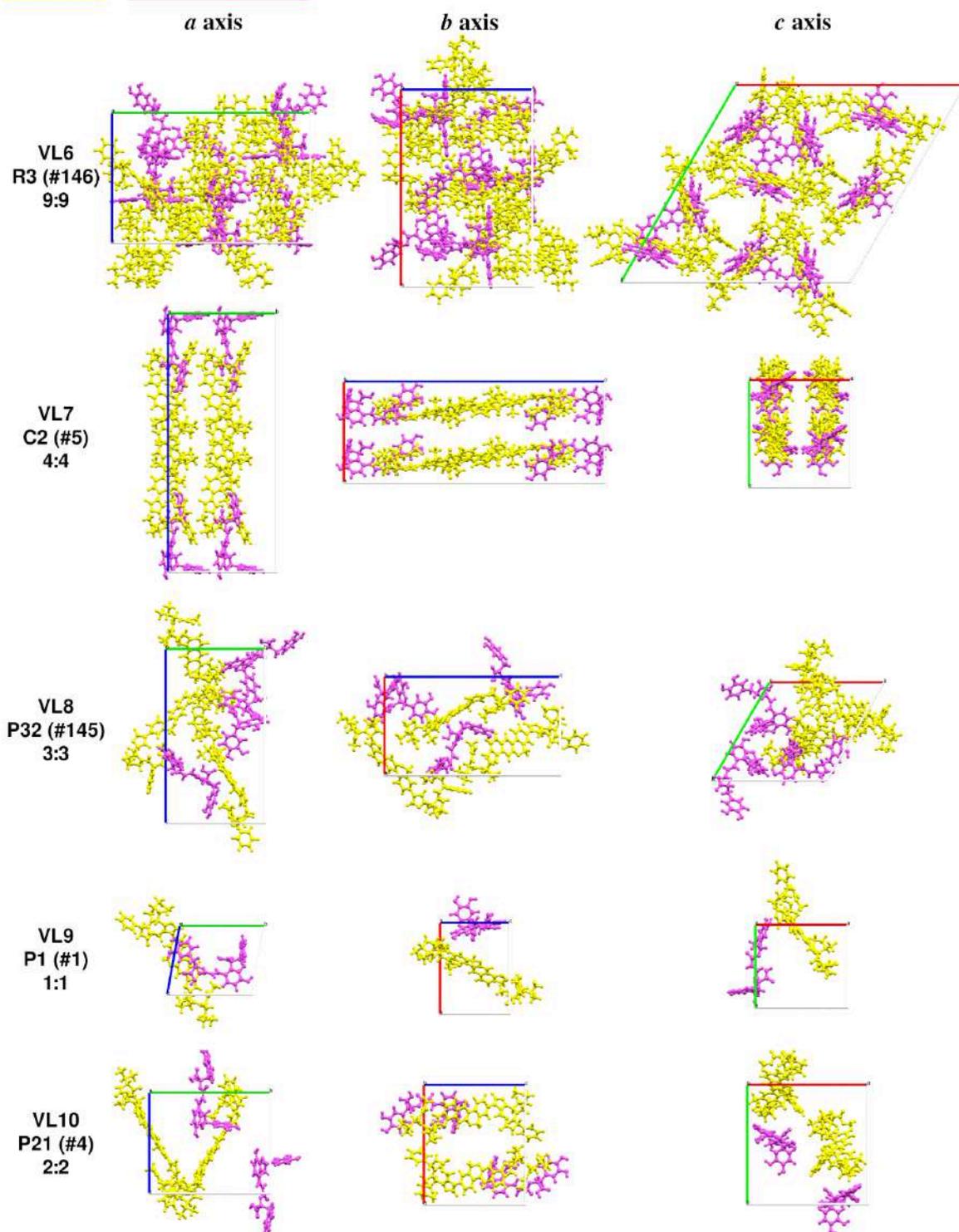


Figura 23. Estruturas 6 a 10 selecionadas de velpatasvir (amarelo) e ácido litospémico (rosa).

4.2.5 CÁLCULOS DE ESTABILIDADE DA CÉLULA CRISTALINA

As células unitárias hipotéticas foram submetidas à alta pressão para ajuste de volume e verificação de estabilidade. Nessa etapa, os algoritmos de cálculos quânticos são mais demorados, por esse motivo foram selecionadas as estruturas hipotéticas por ordem de quantidade de moléculas na célula unitária, sendo a VL2 (1:1) de menor tamanho com o sistema cristalino triclínico (P1, nº 1). Foram realizadas 224 etapas de SCF até atingir a convergência total, com a convergência parcial dos cálculos encontrada entre as etapas 15 e 20, sendo o ponto de inflexão observado no volume e densidade (Figura 24).

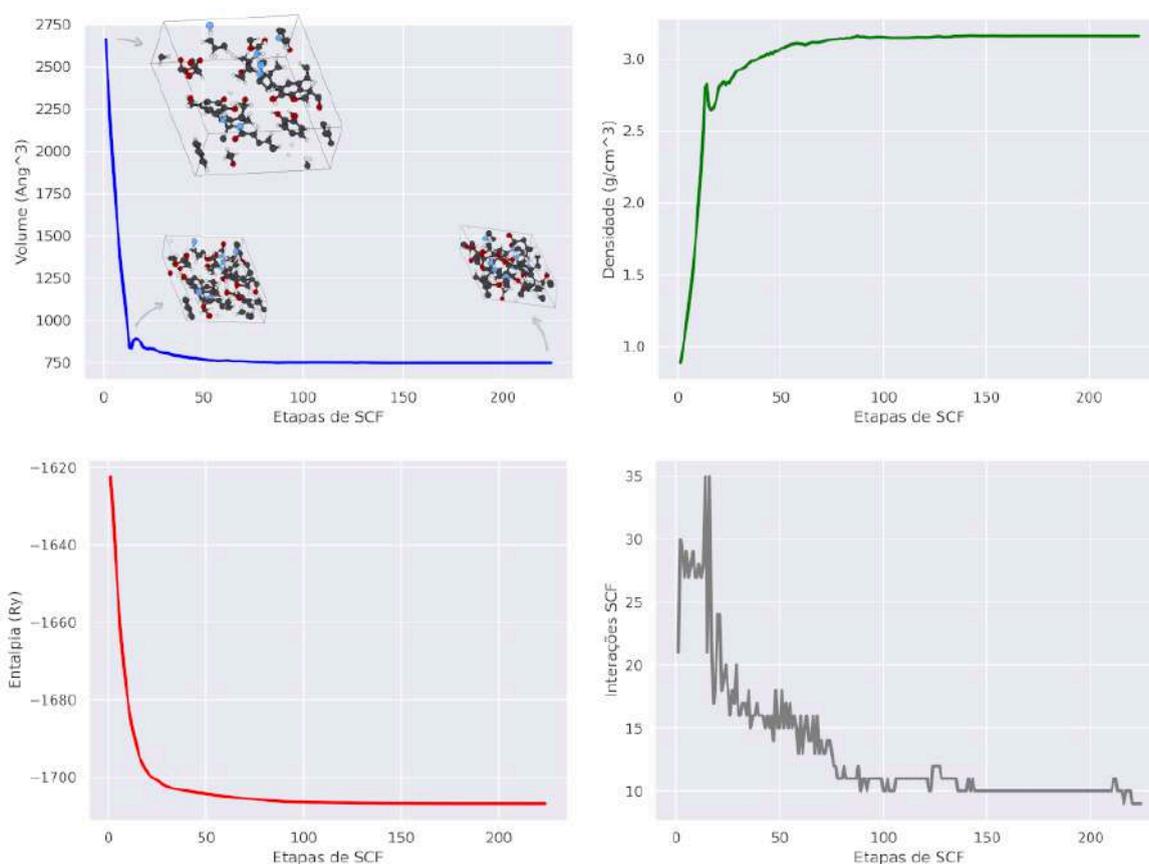


Figura 24. Cálculos realizados para a célula unitária hipotética VL2.

Após os cálculos, a estrutura da célula unitária do VL2 manteve seu sistema cristalino triclínico (Figura 25). O volume final encontrado foi de 746,89 Å³ e a densidade de 3,16 g/cm³.

Célula unitária de VL2

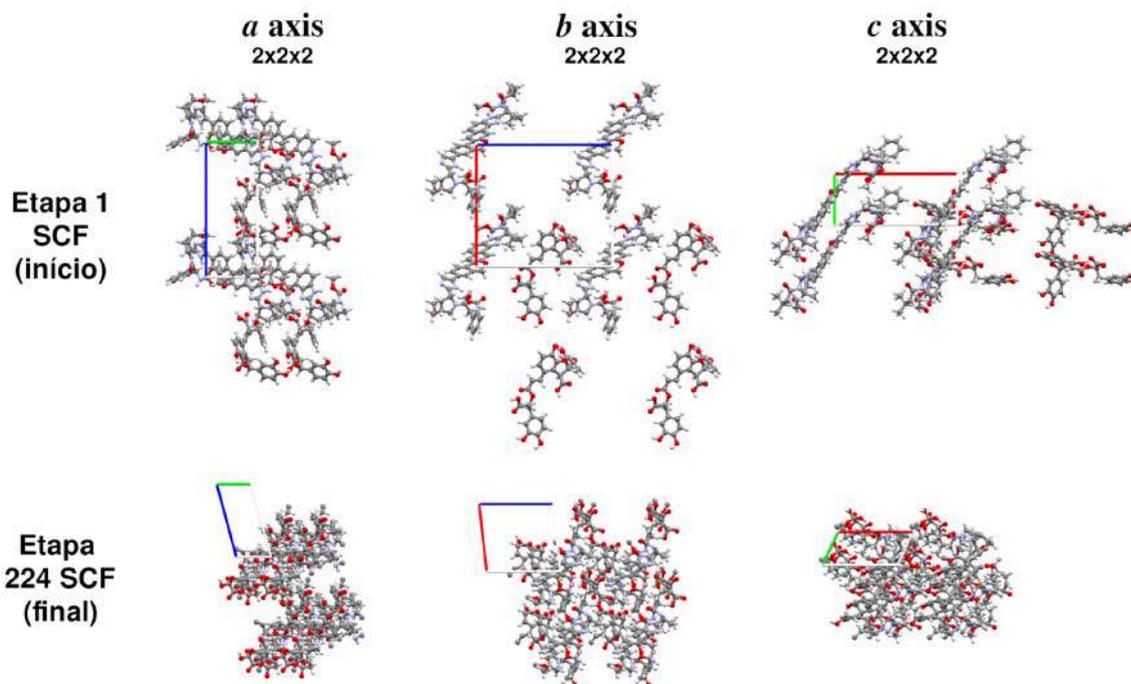


Figura 25. Modificação dos ângulos dos três eixos cálculos de alta pressão da estrutura VL2.

Na sequência foi selecionado o VL3 (2:2) com sistema cristalino monoclinico (P21, nº 4) e 4 moléculas na célula unitária, resultando em cálculos de estabilidade não convergentes, ocasionando erros de sobreposição das densidades eletrônicas dos átomos após serem submetidos à alta pressão. Sendo assim, foi fixada simetria inicial para nova execução dos cálculos, em que os ângulos da célula unitária não são alterados, e ainda assim os cálculos não obtiveram sucesso.

Com isso, foi selecionado o VL1 (3:3) com sistema cristalino trigonal (P31, nº 144) e 6 moléculas na célula unitária, resultando em cálculos não convergentes com a simetria livre para reajuste dos eixos da célula unitária. No entanto, ao fixar a simetria houve avanço dos cálculos, em que o ponto de inflexão de estabilidade ocorreu entre as etapas 20 e 30, contribuindo para elucidação desse sistema cristalino (Figura 26).

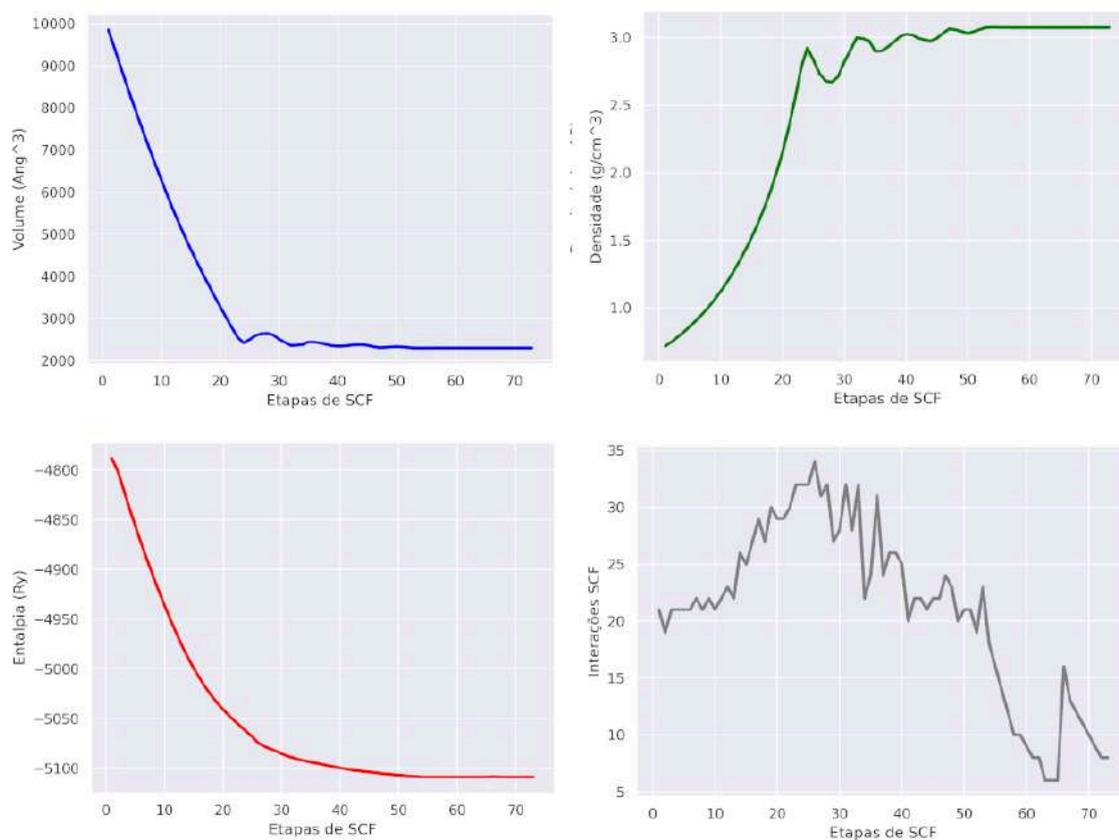


Figura 26. Simetria fixa dos ângulos dos três eixos cálculos de alta pressão da estrutura VL1.

Portanto, foram analisados os três sistemas cristalinos encontrados para os cocrystalos de velpatasvir e ácido litospermico, o triclinico, o monoclinico e o trigonal. Podendo ser o triclinico a estrutura final desse complexo cristalino. As outras estruturas, VL1, VL4, VL5, VL6 e VL8, podem indicar a potencial formação da estrutura cristalina hexagonal ou romboédrica, conhecida como estruturas raras para moléculas orgânicas, em que os ângulos alfa (α) e beta (β) são de 90° e o gamma (γ) de 120° . O sistema monoclinico foi descartado como potencial candidato a estrutura cristalina para esse complexo.

5 DISCUSSÃO

5.1 DESCOBERTA DE NOVOS INIBIDORES

Com o devido rigor técnico, a triagem virtual é uma abordagem computacional importante para identificar potenciais substâncias bioativas (YANG *et al.*, 2021). Os testes *in vitro* acompanhados da simulação de dinâmica molecular corroboraram os dados obtidos, comprovando também que a modelagem molecular do P2X7R foi realizada com qualidade. Como relatado anteriormente, o P2X7R é um alvo molecular emergente para o desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios. Nas últimas décadas, os compostos de origem natural têm sido investigados para inibir a atividade inflamatória (HOANG; KIM, 2021). Neste estudo, os flavonoides se destacaram como a principal classe de substâncias naturais inibidoras do canal P2X7, como a substância narirutina e outros principais ligantes indicados pela triagem virtual. Além disso, alguns flavonoides podem inibir enzimas reguladoras ou fatores de transcrição essenciais para o controle de mediadores envolvidos na inflamação. A classe também é conhecida por ter propriedades antioxidantes potentes com potencial para atenuar danos ou fibrose nos tecidos (BLAKE *et al.*, 2001; MCKELLAR *et al.*, 2009).

O velpatasvir foi a molécula com maior afinidade encontrada neste estudo, desenvolvido para ser um inibidor eficaz da proteína de replicação do vírus da hepatite C (HCV), afetando o complexo de replicação e interrompendo a sinalização do interferon (PAWLOTSKY *et al.*, 2020). Na mesma classe dos antivirais, o abacavir foi descrito anteriormente como modulador da atividade do P2X7R, o que poderia abrir uma nova linha de investigação na expressão e função do P2X7 (COLLADO-DÍAZ *et al.*, 2021).

Um estudo clínico estimou a segurança, tolerabilidade e farmacocinética do velpatasvir em indivíduos saudáveis na presença e ausência de alimentos. Após a administração, o velpatasvir foi seguro e tolerável quando administrado acima de 450 mg juntamente com alimentos (MOGALIAN *et al.*, 2017). Estudos clínicos de fase II mostraram terapias seguras e eficazes com posologia aceitável de velpatasvir/sofosbuvir. Esta combinação auxiliou na adesão terapêutica e resultou

em menor duração do tratamento. Subsequentemente, estudos clínicos de fase III demonstraram que velpatasvir e sofosbuvir são eficazes para pacientes cirróticos previamente tratados (PAWLOTSKY *et al.*, 2020).

O itacitinibe é um inibidor seletivo da Janus quinase 1 (JAK1) com eficácia em modelos pré-clínicos de doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) aguda, complicação que pode ocorrer após um transplante de medula óssea ou de células-tronco (JUVEKAR *et al.*, 2018). Atualmente, itacitinibe está em teste clínicos de fase III para o tratamento de GVHD aguda e crônica em combinação com corticosteroides. Em outro estudo aberto de fase I com pacientes com GVHD tratados com itacitinibe e corticosteroide demonstrou segurança e tolerabilidade. Todos os pacientes que receberam itacitinibe tiveram uso de corticosteroide diminuído ao longo do tempo, e o itacitinibe foi bem tolerado (SCHROEDER *et al.*, 2020).

O ácido litospermico é uma substância isolada das raízes de *Salvia miltiorrhiza*, faz parte da medicina chinesa tradicional conhecida como *Danshen*. O ácido litospermico reduz a função da xantina oxidase, diminuindo o ácido úrico e os radicais superóxido. Além disso, o ácido litospermico elimina os radicais superóxido no sistema β -NADH/PMS e prejudica a produção de superóxido em neutrófilos humanos. A administração oral em ratos inibiu a atividade hipouricêmica e exibiu atividade anti-inflamatória em um modelo de artrite gotosa (LIU *et al.*, 2008). Em outro cenário, um sistema de administração baseado em microemulsão contendo ácido litospermico foi avaliado em modelo murino de dermatite psoriática induzida por imiquimode. O tratamento tópico com ácido litospermico a 0,1% demonstrou eficácia terapêutica ao reverter as lesões cutâneas induzidas por imiquimode, restaurando a função de barreira da pele e suprimindo a ativação do eixo T helper 17/interleucina-23 na epiderme. As vias do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e do eixo T helper 17/interleucina-23 desempenham papéis importantes na patogênese da psoríase, sendo ela uma doença genética de natureza imunomediada, associada predominantemente à ativação das células T helper 1 e T helper 17 (CHEN *et al.*, 2022).

A maioria das substâncias com maior afinidade encontradas como novos inibidores do P2X7R foram descritas em ensaios clínicos de eficácia,

farmacocinética e toxicidade em humanos saudáveis, além de ensaios terapêuticos em alguns casos. Substâncias como velpatasvir, lifitegrast, itacitinibe e hesperidina foram inclusive aprovadas para uso terapêutico. Esse fator incentiva a busca pela ligação seletiva dessas moléculas ao P2X7R e a aplicação terapêutica no tratamento de distúrbios relacionados à sua participação, como observado na artrite reumatoide, na doença de Crohn e em alguns tipos de câncer (MAYUMI *et al.*, 1993; PHADATARE *et al.*, 2015; MOGALIAN *et al.*, 2017; SCHROEDER *et al.*, 2020).

Velpatasvir é um fármaco já aprovado, enquanto o itacitinibe já demonstra que será aprovado brevemente, no entanto ambos são classificados como classe IV no SCB, ou seja, possuem baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Nesse caso, o reposicionamento dos fármacos seria uma alternativa de redução de tempo e custo quando indicados a um novo tratamento, por reduzir os riscos associados às falhas e facilitar a adoção clínica.

5.2 PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS COCRISTAIS

O processo de aprovação de um medicamento passa por diversas etapas clínicas, a primeira seria com poucos indivíduos saudáveis para verificação da dose ideal de tratamento. Essa etapa é fundamental para as etapas clínicas subsequentes, pois a definição da dose segura em indivíduos saudáveis pode garantir um controle terapêutico maior em indivíduos doentes. No entanto, para moléculas com baixa solubilidade, a biodisponibilidade do fármaco acaba sendo um fator limitante para o avanço até um produto final. Nesse caso, o desenvolvimento de cocristais poderia fornecer informações suficientes para novas estratégias de tratamento (LIPP, 2013; CAPPUCCINO *et al.*, 2022).

A narirutina e o ácido litospermico identificados como novos inibidores do canal P2X7 são produtos de origem natural já conhecidos, enquanto as outras duas substâncias são fármacos com suas limitações em solubilidade e permeabilidade, podendo ser investigados para modulação de suas características. Ainda, em outras perspectivas esse estudo poderia ser direcionado ao planejamento de cocristais ternários compreendendo três

moléculas distintas, também conhecidos como cristais multicomponentes (LIU *et al.*, 2018).

A triagem de coformadores, através da complementaridade molecular, é capaz de correlacionar a probabilidade de interação entre as moléculas em 70% e 80% de sucesso quando comparado a outros métodos de triagem de cocrystal (SARKAR *et al.*, 2020; CAPPUCINO *et al.*, 2022). Muitas moléculas consideradas de primeira opção em ensaios experimentais foram descartadas nas etapas de triagem, como o ácido cítrico, ácido malônico, ácido sórbico, a sacarina, entre outros. Muitos métodos e ferramentas estão disponíveis para prever formações de cocrystal, com alguns oferecendo *insights* não apenas sobre a probabilidade de formação, mas também sobre a potencial estrutura cristalina dos cocrystal resultantes.

Em geral, a etapa crítica do processo é a escolha do coformador mais indicado, tradicionalmente a triagem de cocrystal é feita através de métodos convencionais de recristalização, como evaporação de solvente, cristalização de solução, secagem, moagem assistida por líquido, cristalização por fusão, entre outros, o que gera um extenso trabalho de laboratório e abordagens baseadas em tentativa e erro (LEMLI *et al.*, 2024). Um exemplo foi o resultado do velpatasvir que teve maior afinidade com a própria molécula dentre todos os coformadores, sugerindo que ao se utilizar a técnica laboratorial de evaporação de solvente pode-se apresentar dificuldades para formação de cocrystal contendo essa molécula.

No entanto, a realidade dos cristais é ainda mais intrincada devido a diversos fenômenos descritos no processo de empacotamento do cristal. O passo-a-passo simplificado começaria com uma molécula, seguido de poucas moléculas, muitas moléculas, nucleação e cristal, com a possibilidade de mudança variada na organização das moléculas nessas etapas (DESIRAJU, 2013).

5.2.1 POTENCIAIS COCRISTAIS DE LIGANTES BIOATIVOS

Ao realizar a predição de uma célula unitária estável assume-se que os cálculos *ab initio* devem também verificar a estabilidade do formato e volume da

célula unitária sob alta pressão. Sendo assim, ao final da abordagem de otimização de formato e volume realizada somente pelo programa Quantum Espresso, a convergência dos cálculos poderia indicar resultados mais precisos, porém com alto custo computacional.

Como critério relevante, as interações intermoleculares observadas entre os ligantes bioativos selecionados para essa etapa, velpatasvir e ácido litospermico, em destaque as empilhamento- π , podem auxiliar na estabilidade do empacotamento do cocrystal e modular suas propriedades fisico-químicas (SAMIE; ALAVIAN, 2024).

As estruturas cristalinas encontradas organizaram-se em três sistemas cristalinos distintos, sendo eles o triclinico, monoclinico e o trigonal. A escolha para os cálculos quânticos de estabilidade baseou-se na quantidade de moléculas na célula cristalina e nos representantes desses três sistemas cristalinos. Sendo o VL2 (1:1) para triclinico, VL3 (2:2) para monoclinico e o VL1 (3:3) para trigonal.

Segundo o banco dados de estruturas da Universidade de Cambridge (CSD), a estatística gerada em 2024 de 1,29 milhões de estruturas demonstra a distribuição mais frequente dos sete sistemas cristalinos: triclinico (26,2%), monoclinico (51,5%), ortorrômbico (16,9%), tetragonal (2,2%), trigonal (2,0%), hexagonal (0,6%) e cúbico (0,7%) (CSD, 2023). Nesse sentido, os dados convergiram para uma potencial formação de sistema cristalino triclinico, de acordo com a relação estatística apresentada. Embora o sistema monoclinico tenha representado a maioria, para os cocrystal de velpatasvir e ácido litospermico não se confirmou a estabilidade. No entanto, curiosamente, o sistema trigonal, representando 2,0% do CSD, foi o sistema que teve progressão dos cálculos de estabilidade quando esta simetria estava explicitada.

Os cálculos de predição de formação deixam evidente a anisotropia dos cocrystal selecionados e o quão complexo a estrutura final pode se tornar (DESIRAJU, 2013). Ainda, a verificação *in silico* de superfícies hipotéticas dos monocristais gerados poderiam contribuir com informações de interações de solventes, e com isso, poderia-se inferir em relação a sua solubilidade a partir da exposição de grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (PRADO *et al.*, 2020). Como mencionado anteriormente, há uma lacuna na literatura sobre as

técnicas computacionais referentes a predição de formação de cocristais, principalmente de moléculas orgânicas, e este estudo contribui com uma metodologia inovadora para racionalização que, ainda, poderia fornecer dados importantes para algoritmos de aprendizado de máquina (LEMLI *et al.*, 2024).

Por fim, o desenvolvimento de um cocrystal triclinico de velpatasvir e ácido litospermico pode ser uma alternativa para um produto final com maior desempenho na biodisponibilidade de ambos. No entanto, a pesquisa de outros cocristais referentes ao itacitinibe/ácido lactobiônico e o velpatasvir/narirutina poderia ser encaminhada em estudos futuros, por já terem sido detectadas suas afinidades parciais nas etapas anteriores.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÃO

Dentre as milhares de moléculas, preparadas para triagem virtual no P2X7R, dez substâncias apresentaram-se como promissoras. Cinco das substâncias obtidas são flavonoides, com destaque para a narirutina, que possui maior afinidade pelo P2X7R comparado ao ATP e ao A740003 já conhecidos como ligantes na literatura. O velpatasvir foi o fármaco com maior afinidade de interação com o P2X7R. E curiosamente, o abacavir (antiviral) havia sido relatado como modulador da atividade do receptor, trazendo um possível indício do potencial inibitório da classe dos antivirais. Foram selecionadas para simulação de dinâmica molecular o velpatasvir, itacitinibe, narirutina e ácido litospermico, confirmando-se a afinidade favorável dos testes *in vitro*. O velpatasvir e itacitinibe são fármacos classificados como classe IV no SCB, o que pode dificultar suas respectivas biodisponibilidades, enquanto a narirutina e o ácido litospermico são produtos naturais já conhecidos.

Ao realizar a triagem de potenciais coformadores para formação de cocristais, o fármaco velpatasvir mostrou-se propenso a formar cocristais preferencialmente com os dois produtos naturais já selecionados, indicando uma abordagem de dupla-ação. O fármaco itacitinibe, por sua vez, foi o único que se mostrou favorável à cocrystalização com diversas moléculas, em especial com o ácido lactobiônico. O complexo mais favorável foi o velpatasvir e ácido litospermico. Os resultados do planejamento de um cocrystal podem oferecer dados importantes para orientar os estágios do desenvolvimento experimental, isso inclui a racionalização de solventes e IFAs durante as fases experimentais de recristalização. Sendo assim, o sistema cristalino mais indicado para o cocrystal de velpatasvir e ácido litospermico foi o triclinico, que se demonstrou estável nos cálculos *ab initio* de estabilidade sob pressão.

A aplicação deste planejamento associado a outros métodos, tais como *Design of Experiments* (DoE), poderia fornecer informações sistemáticas para o desenvolvimento de um processo eficaz e reprodutível. Esta associação pode

representar uma estratégia poderosa para resolver problemas nos processos de planejamento e fabricação de novos medicamentos formulados em cocristais.

6.2 PERSPECTIVAS

A partir da definição dos ligantes bioativos, em especial o velpatasvir e o ácido litospermico, pode-se indicar racionalmente para ensaios de recristalização, caracterização da solubilidade, taxa de dissolução e, talvez, permeabilidade. Apesar da recristalização laboratorial de cocristais, a depender da técnica, possa encontrar polimorfos distintos devido à complexidade termodinâmica do processo de formação de um monocristal, as milhares de possibilidades investigadas pelos algoritmos auxiliam no encaminhamento dos experimentos. O planejamento de estruturas cristalinas pode auxiliar na viabilidade do desenvolvimento do IFA, na redução de falhas associadas à dose dos testes clínicos, assim como pode fornecer informações para a processabilidade e reprodutibilidade do produto na indústria farmacêutica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM M. J.; MURTOLO T.; SCHULZ R.; PÁLL S.; SMITH J. C.; HESS B.; LINDAHL E.. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**. v1–2, p19-25, ISSN 2352-7110. 2015.

ABRAMSON, J., ADLER, J., DUNGER, J., EVANS, R., GREEN, T., PRITZEL, A., RONNEBERGER, O., WILLMORE, L., BALLARD, A. J., BAMBRICK, J., BODENSTEIN, S. W., EVANS, D. A., HUNG, C., O'NEILL, M., REIMAN, D., TUNYASUVUNAKOOL, K., WU, Z., ŽEMGULTYĖ, A., ARVANITI, E., . . . JUMPER, J. M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. **Nature**, 630(8016), 493–500. 2024.

ALONSO H.; BLIZNYUK A. A.; GREASY J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Med Res Rev**. 26(5):531-568. 2006.

ANVISA. RESOLUÇÃO - RDC Nº 753, DE 28 DE SETEMBRO DE 2022 - DOU - **Imprensa Nacional**. Disponível em <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-753-de-28-de-setembro-de-2022-433925794>>

AMIDON G. L.; LENNERNÄS H.; SHAH V. P.; CRISON J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm Res**. 12(3):413-420. 1995.

BARALDI P. G.; DEL CARMEN NUÑEZ M.; MORELLI A.; FALZONI S.; DI VIRGILIO F.; ROMAGNOLI R. Synthesis and biological activity of N-aryl piperazine-modified analogs of KN-62, a potent antagonist of the purinergic P2X7 receptor. **J Med Chem**. 46,1318-1329. 2003.

BARDWELL, D. A.; ADJIMAN, C. S.; ARNAUTOVA, Y. A.; BARTASHEVICH, E.; BOERRIGTER, S. X. M.; BRAUN, D. E.; CRUZ-CABEZA, A. J.; DAY, G. M.; VALLE, R. G. D.; DESIRAJU, G. R.; VAN EIJCK, B. P.; FACELLI, J. C.; FERRARO, M. B.; GRILLO, D.; HABGOOD, M.; HOFMANN, D. W. M.;

HOFMANN, F.; JOSE, K. V. J.; KARAMERTZANIS, P. G.; KAZANTSEV, A. V.; KENDRICK, J.; KULESHOVA, L. N.; LEUSEN, F. J. J.; MALEEV, A. V.; MISQUITTA, A. J.; MOHAMED, S.; NEEDS, R. J.; NEUMANN, M. A.; NIKYLOV, D.; ORENDT, A. M.; PAL, R.; PANTELIDES, C. C.; PICKARD, C. J.; PRICE, L. S.; SCHERAGA, H. A.; VAN DE STREEK, J.; THAKUR, T. S.; TIWARI, S.; VENUTI, E.; ZHITKOV, I. K. Towards Crystal Structure Prediction of Complex Organic Compounds – A Report on the Fifth Blind Test. **Acta Cryst.** v. 67, 535-551, 2011.

BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W.; MORRIS, J. Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism. **Pharmaceutical Research.** Jun, 18(6), p 859-66, 2001.

BELLO, M. L.; MENDES G. E. M.; SILVA A. C. R.; FARIA, R. X. Virtual screening indicates potential inhibitors of the P2X7 receptor. **Computers in Biology and Medicine.** v164, 107299, ISSN 0010-4825. 2023.

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

BERNARDINO, G. A. G. S.; MARICATO, G. Gestão da cadeia de suprimentos no agronegócio: desafios e oportunidades no contexto atual. In: ENCONTRO DE LOGÍSTICA DAS FATECs – FATECLOG, 12. Mogi das Cruzes: FATEC Mogi das Cruzes, 2021. Disponível em: <<https://fateclog.com.br/anais/2021/parte4/598-790-1-RV.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2025.

BERNSTEIN, J. Polymorphism and patents. *Polymorphism in Molecular Crystals.* **Oxford University Press.** p. 297-307, 2007.

BITENCOURT-FERREIRA, G., DE AZEVEDO, W. F. Molegro virtual docker for docking. **Methods in Molecular Biology,** 149–167. 2019.

BLAKE A.J.; LIPPOLIS V.; PARSONS S.; SCHRÖDER M. cate-na-Poly[transdichlorocopper(II)-mu-1,4,7,10,13,16-hexathiacyclooctadecane-S1:S10], **Acta Crystallogr. C** 57 36–37. 2001.

BHATTACHARYA, A.; BIBER, K. The microglial ATP-gated ion channel P2X7 as a CNS drug target. **Glia**, 64(10), 1772–1787, 2016.

BOEGESOE Klaus P, JENS P. Pharmaceutically useful (+)-1-(3-dimethylaminopropyl)-1-(40-fluorophenyl)-1,3-dihydrosobenzofuran-5-carbonitrile and non-toxic acid addition salts thereof. **(U.S. Patent No. 4943590 A)**. Available from <https://lens.org/003-034-852-408-036>; (1990).

BOLLA, G.; NANGIA, A. Pharmaceutical cocrystals: walking the talk. **Chem. Commun.** v. 52(54), p. 8342–8360, 2016.

BURNSTOCK G. P2X ion channel receptors and inflammation. **Purinergic Signal.** v. 12(1), p. 59-67. 2016.

BYRN, S. R.; PFEIFFER, R. R.; STOWELL, J. G. Solid-State Chemistry of Drugs. 2 nd. **West Lafayette: Ssci Inc.** p. 574, 1999.

CASE D.A.; AKTULGA H.M.; BELFON K.; BEN-SHALOM I.Y.; BERRYMAN J.T.; BROZELL S.R.; CERUTTI D.S.; CHEATHAM T.E. III; CISNEROS G.A.; CRUZEIRO V.W.D.; DARDEN T.A.; FOROUZESH N.; GIAMBAŞU G.; GIESE T.; GILSON M.K.; GOHLKE H.; GOETZ A.W.; HARRIS J.; IZADI S.; IZMAILOV S.A.; KASAVAJHALA K.; KAYMAK M.C.; KING E.; KOVALENKO A.; KURTZMAN T.; LEE T.S.; LI P.; LIN C.; LIU J.; LUCHKO T.; LUO R.; MACHADO M.; MAN V.; MANATHUNGA M.; MERZ K.M.; MIAO Y.; MIKHAILOVSKII O.; MONARD G.; NGUYEN H.; O'HEARN K.A.; ONUFRIEV A.; PAN F.; PANTANO S.; QI R.; RAHNAMEOUN A.; ROE D.R.; ROITBERG A.; SAGUI C.; SCHOTT-VERDUGO S.; SHAJAN A.; SHEN J.; SIMMERLING C.L.; SKRYNNIKOV N.R.; SMITH J.; SWAILS J.; WALKER R.C.; WANG J.; WANG J.; WEI H.; WU X.; WU Y.; XIONG Y.; XUE Y.; YORK D.M.; ZHAO S.; ZHU Q.; KOLLMAN P.A. Amber 2023, **University of California**, San Francisco. 2023.

CAPPUCCINO, C.; CUSACK, D.; FLANAGAN, J.; HARRISON, C.; HOLOHAN, C.; LESTARI, M.; WALSH, G.; LUSI, M. How Many Cocrystals Are We Missing? Assessing Two Crystal Engineering Approaches to Pharmaceutical Cocrystal Screening. **Crystal Growth & Design.** 22 (2), p. 1390-1397, 2022.

CSD, Cambridge Structural Database. CSD Crystal System Statistics. In **Cambridge Structural Database**. 2024. Disponível em <<https://www.ccdc.cam.ac.uk/media/CSD-Crystal-System-Statistics-2024.pdf>>.

Acessado em mar. 2025.

CHEN, Y.; LI, L.; YAO, J.; MA, Y., CHEN, J.; LU, T. Improving the Solubility and Bioavailability of Apixaban via Apixaban–Oxalic Acid Cocrystal. **Crystal Growth & Design**. v. 16 (5), p. 2923-2930, 2016.

CHEN, W.; LIU, X.; ZHANG, S.; CHEN, S. Artificial intelligence for drug discovery: Resources, methods, and applications. **Molecular Therapy — Nucleic Acids**, 31, 691–702. 2023.

COLLADO-DÍAZ V.; MARTINEZ-CUESTA M. Á.; BLANCH-RUIZ M. A.; *et al.* Abacavir Increases Purinergic P2X7 Receptor Activation by ATP: Does a Pro-inflammatory Synergism Underlie Its Cardiovascular Toxicity?. *Front Pharmacol*. 2021;12:613449. 2021.

DESIRAJU, G. R. (2013). Crystal Engineering: From Molecule to Crystal. **Journal of the American Chemical Society**, 135(27), 9952–9967. doi:10.1021/ja403264c

DI VIRGILIO F.; BEN D.D.; SARTI A.C.; GIULIANI A.L.; FALZONI S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**. v. 47,1,18, p. 15-31. 2017.

DOMINGOS, S.; ANDRE V.; QUARESMA, S.; MARTINS I. C. B.; PIEDADE, M. F. M.; DUARTE M. T. New forms of old drugs: Improving without changing. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 6, p. 830–846, 2015.

DOS SANTOS, E. G.; FARIA, R. X.; RODRIGUES, C. R.; BELLO, M. L. Molecular dynamic simulations of full-length human purinergic receptor subtype P2X7 bonded to potent inhibitors. **European journal of pharmaceutical sciences**. 152, 105454. 2020.

DRILL M.; JONES N. C.; HUNN M.; O'BRIEN T. J.; MONIF M. Antagonism of the ATP-gated P2X7 receptor: a potential therapeutic strategy for cancer. **Purinergic Signal**. 17(2):215-227. 2021.

DYMACEK, et al. Pharmaceutical composition comprising sacubitril and valsartan (U.S. Patent No. 10,588,892). **U.S. Patent and Trademark Office**. 2018. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021074808>

FERRARI D.; VITIELLO L.; IDZKO M.; LA SALA A. Purinergic signaling in atherosclerosis. **Trends Mol Med**. v. 21(3), p. 184-192. 2015.

FDA, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. ANDAS: Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. **U.S. Food And Drug Administration**. 2020. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/anda-pharmaceutical-solid-polymorphism-chemistry-manufacturing-and-controls-information>>. Acesso em: mar. 2025.

FDA, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. **PAT – A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance**. 2004. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/pat-framework-innovative-pharmaceutical-development-manufacturing-and-quality-assurance>>. Acesso em: jul. 2022.

FRIEDLE S. A.; CURET M. A.; WATTERS J. J. Recent patents on novel P2X(7) receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. **Recent Pat CNS Drug Discov**. 5,35-45. 2010.

FORESMAN J. B., FRISCH A. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, 3rd ed., **Gaussian, Inc.: Wallingford, CT**, 2015.

GASCON, N.; ALMANSA, C.; MERLOS, M.; VELA, J. M.; ENCINA, G.; MORTE, A.; SMITH, K.; PLATA-SALAMÁN, C. Co-crystal of tramadol-celecoxib: preclinical and clinical evaluation of a novel analgesic. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 28(5), 399–409. 2019.

GAO, Z.; ROHANI, S.; GONG, J., WANG, J. Recent Developments in the Crystallization Process: Toward the Pharmaceutical Industry. **Engineering**. v 3 (3), p 343-353, 2017.

GIANNOZZI, P.; BARONI, S.; BONINI, N.; CALANDRA, M.; CAR, R.; CAVAZZONI, C.; D. CERESOLI, G. L. CHIAROTTI, M. COCOCCIONI, I. DABO, A. DAL CORSO, S. FABRIS, G. FRATESI, S. DE GIRONCOLI, R. GEBAUER, U. GERSTMANN, C. GOUGOUSSIS, A. KOKALJ, M. LAZZERI, L. MARTIN-SAMOS, N. MARZARI, F. MAURI, R. MAZZARELLO, S. PAOLINI, A. PASQUARELLO, L. PAULATTO, C. SBRACCIA, S. SCANDOLO, G. SCLAUZERO, A. P. SEITSONEN, A. SMOGUNOV, P. UMARI, R. M. WENTZCOVITCH, **J. Phys.: Condens.Matter** 21, 395502. 2009.

GIANNOZZI, P.; ANDREUSSI, O.; BRUMME, T.; BUNAU, O.; BUONGIORNO, M.; NARDELLI, M. CALANDRA, R. CAR, C. CAVAZZONI, D. CERESOLI, M. COCOCCIONI, N. COLONNA, I. CARNIMEO, A. DAL CORSO, S. DE GIRONCOLI, P. DELUGAS, R. A. DISTASIO JR, A. FERRETTI, A. FLORIS, G. FRATESI, G. FUGALLO, R. GEBAUER, U. GERSTMANN, F. GIUSTINO, T. GORNI, J JIA, M. KAWAMURA, H.-Y. KO, A. KOKALJ, E. KÜÇÜKBENLI, M. LAZZERI, M. MARSILI, N. MARZARI, F. MAURI, N. L. NGUYEN, H.-V. NGUYEN, A. OTERO-DE-LA-ROZA, L. PAULATTO, S. PONCÉ, D. ROCCA, R. SABATINI, B. SANTRA, M. SCHLIPF, A. P. SEITSONEN, A. SMOGUNOV, I. TIMROV, T. THONHAUSER, P. UMARI, N. VAST, X. WU, S. BARONI. Advanced capabilities for materials modelling with Quantum ESPRESSO. **Journal of Physics Condensed Matter**, 29(46), 465901. 2017.

GROOM, C. R., BRUNO, I. J., LIGHTFOOT M. P. and WARD. S. C. **The Cambridge Structural Database., Acta Cryst.** B72, 171-179. (2016).

GUAN, D., XUAN, B., WANG, C., LONG, R., JIANG, Y., MAO, L., KANG, J., WANG, Z., CHOW, S. F., ZHOU, Q. Improving the Physicochemical and Biopharmaceutical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients Derived from Traditional Chinese Medicine through Cocrystal Engineering. **Pharmaceutics**, 13(12), 2160. 2021.

HABERMACHER, C.; DUNNING, K.; CHATAIGNEAU, T.; GRUTTER, T. Molecular structure and function of P2X receptors. **Neuropharmacology**, 104, 18–30. 2015.

HAHN, T. International Tables for Crystallography. **Volume A: Space Group Symmetry, International Tables for Crystallography**, vol. 5th edition (second online edition), ISBN 978-0-470-97423-0, 2016.

HALEBLIAN, J. K. Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications. **J Pharm Sci.** v. 64(8), p. 1269-88, 1975.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, p. 490-519, 1996.

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

HASKINS, M.; ZAWOROTKO, M. Screening and Preparation of Cocrystals: A Comparative Study of Mechanochemistry vs Slurry Methods. **Crystal Growth & Design**, 2021.

HATTORI, M.; GOUAUX, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. **Nature**, 485(7397), 207–212, 2012.

HEHRE, W. J. A Guide to Molecular Mechanisms and Quantum Chemical Calculations. **Wavefunction inc**, 2003.

HINCHLIFFE, A. Molecular Modelling for Beginners. **John Wiley & Sons Ltd**, 2006.

HOANG, T.; KIM, J. Phytonutrient supplements and metabolic biomarkers of cardiovascular disease: An umbrella review of meta-analyses of clinical trials. **Phytotherapy Research**, 35(8), 4171–4182. 2021.

JI X.; NAITO Y.; HIROKAWA G; *et al.* P2X(7) receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. **Hypertension research**. v. 35(2), p. 173-9. 2012.

JUVEKAR, A.; RUGGERI, B. CONDON S. Itacitinib, a. 2018. Disponível em <<https://www.professionalabstracts.com/ebmt2018/programme-ebmt2018.pdf>>

Acessado em abr. 2025.

HONORE, P., DONNELLY-ROBERTS, D., NAMOVIC, M. T., HSIEH, G., ZHU, C. Z., MIKUSA, J. P., HERNANDEZ, G., ZHONG, C., GAUVIN, D. M., CHANDRAN, P., HARRIS, R., MEDRANO, A. P., CARROLL, W., MARSH, K., SULLIVAN, J. P., FALTYNEK, C. R., JARVIS, M. F. A-740003

[N-(1-((Cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a Novel and Selective P2X7 Receptor Antagonist, Dose-Dependently Reduces Neuropathic Pain in the Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 319(3), 1376–1385. 2006.

JIANG, L.; HUANG, Y.; ZHANG, Q.; HE, HONGYAN.; XU, YUN.; MEI, X. Preparation and Solid-State Characterization of Dapsone Drug-Drug Co-Crystals. **Crystal Growth & Design**. v. 14, p. 4562-4573, 2014.

JIN, H., LI, M., JEONG, E., CASTRO-MARTINEZ, F., ZUKER, C. S. A body–brain circuit that regulates body inflammatory responses. **Nature**, 630(8017), 695–703. 2024.

JO S.; KIM T.; IM W. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. **PLoS ONE** 2(9):e880. 2007.

JO S.; LIM J.B.; KLAUDA J.B.; IM W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. **Biophys. J.** 97:50-58. 2009.

KAMYA, P.; OZEROV, I. V.; PUN, F. W.; TRETINA, K.; FOKINA, T.; CHEN, S.; NAUMOV, V.; LONG, X.; LIN, S.; KORZINKIN, M.; POLYKOVSKIY, D.; ALIPER, A.; REN, F.; ZHAVORONKOV, A. PandaOmics: an AI-Driven platform for therapeutic target and biomarker discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 64(10), 3961–3969. 2024.

KARASAWA, A.; KAWATE, T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. **eLife**, 5, 2016.

KAWABATA, Y. *et al.* Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, p. 1-10, 2011.

KOKALJ, A. Computer graphics and graphical user interfaces as tools in simulations of matter at the atomic scale, **Comp. Mater. Sci.**, 28, 155-168. 2003.

KUSSMANN, M.; CUNHA, D. H. A.; BERCIANO, S. Bioactive compounds for human and planetary health. *Frontiers in Nutrition*, 10. 2023.

LEE J.; PATEL D.S.; Stähle J.; PARK S-J.; KERN N.R.; KIM S.; LEE J.; CHENG X.; VALVANO M.A.; Holst O.; Knirel Y.; QI Y.; JO S.; Klauda J.B.; Widmalm G.; IM W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans. **J. Chem. Theory Comput.** 15:775-786. 2019.

LEMLI, B., PÁL, S., SALEM, A., SZÉCHENYI, A. Prioritizing Computational cocrystal Prediction Methods for Experimental researchers: A review to find Efficient, Cost-Effective, and User-Friendly approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, 25(22), 12045. 2024.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**. Volume 6, Issue 3. p. 402-406, 1996.

LIANG, L.; CHEN, E.; SHEN, J.; WANG, Q. Molecular modelling of translocation of biomolecules in carbon nanotubes: method, mechanism and application. **Molecular Simulation**, v. 42:10, p. 827-835, 2016.

LILI F, ERIK GS, ALLEN SP, MAHAVIR P, GIRGIS MICHAEL J, BIN H, et al. Compounds containing S-n-valeryl-n-[[20-(1h-tetrazole-5-yl)-biphenyl-4-yl]-methyl]- valine and (2r,4s)-5-biphenyl-4-yl-4-(3-carboxy-propionylamino)-2-methyl- pentanoic acid ethyl ester moieties and cations. **(U.S. Patent No. 9388134 B2)**. Available from <https://lens.org/083-337-018-634-832>; (2016).

LIPP, R. The innovator pipeline: bioavailability challenges and advanced oral drug delivery opportunities. **Am. Pharm. Rev**, 16(3), 14-16 (2013).

LIU F, SONG Y, LIU Y-N, LI Y-T, WU Z-Y, YAN C-W. Drug-bridge-drug ternary cocrystallization strategy for antituberculosis drugs combination. **Cryst Growth Des.** 18(3):1283–6. 2018.

LIU, L., WANG, C., DUN, J., CHOW, A. H. L., SUN, C. C. Lack of dependence of mechanical properties of baicalein cocrystals on those of the constituent components. **CrystEngComm**, 20(37), 5486–5489. 2018.

LIU, X., CHEN, R., SHANG, Y., JIAO, B., HUANG, C. Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2–3), 137–142. 2008.

LYAKHOV A.O., OGANOV A.R., STOKES H.T., ZHU Q. New developments in evolutionary structure prediction algorithm USPEX. **Comp. Phys. Comm.** 184, 1172-1182. 2013.

LV, Q.; ZHOU, F.; LIU, X.; ZHI, L. Artificial intelligence in small molecule drug discovery from 2018 to 2023: Does it really work? **Bioorganic Chemistry**, 141, 106894. 2023.

MAGALHÃES P. F.; LANZA F. C.; BERNARDO F. B. Clinical features and physiotherapy management for Covid-19 in children. **Minerva Pediatr.** 10.23736/S0026-4946.20.06100-9 Advance online publication. 2020.

MANDELL J. G.; ROBERTS V. A.; PIQUE M. E., Kotlovii V.; MITCHELL, J. C.; NELSON, E.; TSIGELNY, I.; EYCK L. F. T. Protein docking using continuum electrostatics and geometric fit. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 14. p. 105–113, 2001.

MARSHALL, G. R. Em Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In **Chemoinformatics in Drug Discovery**; WILEY-VHC: Weinheim. 2004.

MASAKAZU I, KEITA N, RYOTA S, KENICHI O, DAISUKE S, MASAMICHI Y. Cocrystal of C-glycoside derivative and L-proline. (**U.S. Patent No. 8097592 B2**). Available from <https://lens.org/197-214-014-255-222>, 2012.

MAYUMI, K., SEIKO, T., MASA-AKI, S., MASAO, H., SHOJI, F., & NOBUYUKI, I. Subchronic toxicity study of methyl hesperidin in mice. **Toxicology Letters**, 69(1), 37–44. 1993.

MERCHANT, A., BATZNER, S., SCHOENHOLZ, S. S., AYKOL, M., CHEON, G., CUBUK, E. D. Scaling deep learning for materials discovery. **Nature**, 624(7990), 80–85. 2023.

MCKELLAR G. E; MCCAREY D.W.; SATTAR N.; MCINNES I.B. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune dis-ease, **Nat. Rev. Cardiol.** 6 410–417. 2009.

MICHEL, A. D., NG, S., ROMAN, S., CLAY, W. C., DEAN, D. K., WALTER, D. S. Mechanism of action of species-selective P2X7 receptor antagonists. **British Journal of Pharmacology**, 156(8), 1312–1325. 2009.

MILLER, B. R.; MCGEE, T. D.; Jr, SWAILS, J. M.; HOMEYER, N.; GOHLKE, H.; ROITBERG, A. E. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. **Journal of chemical theory and computation.** 8(9), 3314–3321. 2012.

MISHRA, S., SHELKE, V., DAGAR, N., LECH, M., GAIKWAD, A. B.. Molecular insights into P2X signalling cascades in acute kidney injury. **Purinergic Signalling**, 20(5), 477–486. 2024.

MOGALIAN E.; GERMAN P.; KEARNEY B.P.; YANG C.Y.; BRAINARD D.; LINK J.; MCNALLY J.; HAN L.; LING J.; MATHIAS A. Preclinical pharmacokinetics and first-in-human pharmacokinetics, safety, and tolerability of velpatasvir, a pangenotypic hepatitis C virus NS5A inhibitor, in healthy subjects, **Antimicrob. Agents Chemother.** 61, e02084-16. 2017.

MOMMA, K.; IZUMI, F. "VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data," *J. Appl. Crystallogr.*, 44, 1272-1276. 2011).

MORISSETTE, S. L.; ALMARSSON, Ö.; PETERSON, M. L.; REMENAR, J. F.; READ, M. J.; LEMMO, A. V.; ELLIS, S.; CIMA, M. J.; GARDNERA, C. R. High throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 275-300, 2004.

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer S & Dementia Translational Research & Clinical Interventions**, 3(4), 651–657. 2017.

MULLARD, A. The drug-maker's guide to the galaxy. **Nature**, 549(7673), 445–447. 2017.

NISHIHARA S. BURAI, a GUI system of Quantum ESPRESSO. 2018. <https://burai.readthedocs.io/en/latest/>

NIU L.; WEI J.; LI X.; JIN Y.; SHI X. Inhibitory activity of narirutin on RBL-2H3 cells degranulation, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 43, 68–76. 2021.

NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY. (n.d.). NobelPrize.org. Acesso em dezembro de 2024 <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/press-release/>>

NUGRAHANI I, JESSICA MA. Amino Acids as the Potential Co-Former for Co-Crystal Development: A Review. **Molecules**. 26(11):3279. 2021.

O'NEIL, M. J. (ed.). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: **Merck and Co., Inc.**, p. 1163, 2001.

OGANOV A.R., GLASS C.W. Crystal structure prediction using ab initio evolutionary techniques: principles and applications. **J. Chem. Phys.**, 124, art. 244704. 2006.

OGANOV A.R., LYAKHOV A.O., VALLE M. How evolutionary crystal structure prediction works - and why. **Acc. Chem. Res.** 44, 227-237, 2011.

PAGADALA, N.S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophys Review** 9, p. 91-102, 2017.

PAGGI, J. M., PANDIT, A., DROR, R. O. The art and science of molecular docking. **Annual Review of Biochemistry**, 93(1), 389–410. 2024.

PAWLOTSKY, J., NEGRO, F., AGHEMO, A., BERENQUER, M., DALGARD, O., DUSHEIKO, G., MARRA, F., PUOTI, M., WEDEMEYER, H. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series. **Journal of Hepatology**, 73(5), 1170–1218. 2020.

PERCHA B.; ALTMAN R.B. Informatics confronts drug-drug interactions. **Trends Pharmacol Sci.** v. 34(3), p. 178-84, 2013.

PHADATARE, S. P., MOMIN, M., NIGHOJKAR, P., ASKARKAR, S., & SINGH, K. K. A comprehensive review on dry eye disease: diagnosis, medical management, recent developments, and future challenges. **Advances in Pharmaceutics**, 2015, 1–12. 2015.

PRADO, L. D.; PATRICIO, B. F. C.; GONÇALVES, K. M.; SANTOS, A. B. X.; BELLO, M. L.; ROCHA, G. M.; WEISSMULLER, G.; BISCH, P. M.; RESENDE, J. A. L. C.; ROCHA, H. V. A. Pharmaceutical Material Engineering: Evaluation of Carvedilol Polymorphs II and III Surface by Packing, Modeling, and Atomic Force Measurements. **Crystal Growth & Design.** v. 20 (12), p. 7901-7909, 2020.

PULIDO, A.; CHEN, L.; KACZOROWSKI, T.; *et al.* Functional materials discovery using energy–structure–function maps. **Nature** 543, p. 657–664, 2017.

RAY, D.; YUNG, R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. **Clinical Immunology.** 196, 59–63. 2018.

SAESMAA, T.; TÖTTERMAN A. M. Dissolution studies on ampicillin embonate and amoxicillin embonate. **J Pharm Biomed Anal**; 8(1): p. 61, 1990.

SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. (2012). An overview of the Amber biomolecular simulation package. **Wiley Interdisciplinary Reviews Computational Molecular Science**, 3(2), 198–210. 2012.

SAMIE, A.; ALAVIAN, H. A perspective on the permeability of Cocrystals/Organic salts of oral drugs. **Molecular Pharmaceutics**, 21(10), 4860–4911. 2024.

SANJUAN-SZKLARZ, W; FABIOLA et al. On the accuracy and precision of X-ray and neutron diffraction results as a function of resolution and the electron density model. **IUCrJ** vol. 7,Pt 5 920-933. 2020.

SARKAR, N.; GONNELLA, N. C.; KRAWIEC, M.; XIN, D.; AAKERÖY, C. B.; Evaluating the Predictive Abilities of Protocols Based on Hydrogen-Bond Propensity, Molecular Complementarity, and Hydrogen-Bond Energy for Cocrystal Screening. **Crystal Growth & Design**. 20 (11), 7320-7327, 2020.

SAVAGE, N. Tapping into the drug discovery potential of AI. **Biopharma Dealmakers**. 2021.

SCHROEDER, M. A., KHOURY, H. J., JAGASIA, M., ALI, H., SCHILLER, G. J., STASER, K., CHOI, J., GEHRS, L., ARBUSHITES, M. C., YAN, Y., LANGMUIR, P., SRINIVAS, N., PRATTA, M., PERALES, M., CHEN, Y., MEYERS, G., & DIPERSIO, J. F. A phase 1 trial of itacitinib, a selective JAK1 inhibitor, in patients with acute graft-versus-host disease. **Blood Advances**, 4(8), 1656–1669. 2020.

SELVARAJ, C.; CHANDRA, I.; SINGH, S. K. Artificial intelligence and machine learning approaches for drug design: challenges and opportunities for the pharmaceutical industries. **Molecular Diversity**, 26(3), 1893–1913. 2021.

SMITH, A. J., KAVURU, P., WOJTAS, L., ZAWOROTKO, M. J., SHYTLE, R. D. Cocrystals of Quercetin with Improved Solubility and Oral Bioavailability. **Molecular Pharmaceutics**, 8(5). 2011.

STEED, J. W. The role of co-crystals in pharmaceutical design. **Trends in Pharmacological Sciences**. v 34(3), p. 185-193, 2013.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. **J. Mol. Modeling**: v. 13, p. 1173-1213, 2007.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters **J. Mol. Modeling**: v 19, p. 1-32, 2013.

STEWART, J. J. P. MOPAC2016. **Stewart Computational Chemistry**. Disponível em: <<http://openmopac.net/>>, 2016.

SOLIMAN, A. M.; BARREDA, D. R. Acute inflammation in tissue healing. **International Journal of Molecular Sciences**. 24(1), 641, 2022.

SURESH, K.; GOUD, N. R.; NANGIA, A. Andrographolide: solving chemical instability and poor solubility by means of cocrystals. **Chemistry - an Asian Journal**, 8(12), 3032–3041. 2013.

SZYMANSKI, N. J., RENDY, B., FEI, Y., KUMAR, R. E., HE, T., MILSTED, D., MCDERMOTT, M. J., GALLANT, M., CUBUK, E. D., MERCHANT, A., KIM, H., JAIN, A., BARTEL, C. J., PERSSON, K., ZENG, Y., CEDER, G. An autonomous laboratory for the accelerated synthesis of novel materials. **Nature**, 624(7990), 86–91. 2023.

TAKEDA T.; HAO M.; CHENG T.; BRYANT S. H.; WANG Y. Predicting drug-drug interactions through drug structural similarities and interaction networks incorporating pharmacokinetics and pharmacodynamics knowledge. **J Cheminform**. 7,9-16. 2017.

TICEHURST, M. D.; MARZIANO, I. Integration of active pharmaceutical ingredient solid form selection and particle engineering into drug product design. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 6, p. 782–802, 2015.

TSAO, C. W.; ADAY, A. W.; ALMARZOOQ, Z. I.; ANDERSON, C. A.; ARORA, P.; AVERY, C. L.; BAKER-SMITH, C. M.; BEATON, A. Z.; BOEHME, A. K.; BUXTON, A. E.; COMMODORE-MENSAH, Y.; ELKIND, M. S.; EVENSON, K. R.;

EZE-NLIAM, C.; FUGAR, S.; GENEROSO, G.; HEARD, D. G.; HIREMATH, S.; HO, J. E.; . . . MARTIN, S. S. Heart disease and stroke statistics—2023 Update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, 147(8), 2023.

TSUDA M. P2 receptors, microglial cytokines and chemokines, and neuropathic pain. **J Neurosci Res**. v. 95(6), p. 1319-1329. 2017.

TRASK, A. V.; MOTHERWELL W. D. S.; JONES W.. Pharmaceutical Cocrystallization: Engineering a Remedy for Caffeine Hydration. **Crystal Growth & Design**. v. 5 (3), p. 1013-1021, 2005.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, 49 (11), 3315-3321, 2006.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47(D1), D506–D515. 2019.

VAZQUEZ-GARZA, E.; JERJES-SANCHEZ, C.; NAVARRETE, A.; JOYA-HARRISON, J.; RODRIGUEZ, D. Venous thromboembolism: thrombosis, inflammation, and immunothrombosis for clinicians. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 44(3), 377–385, 2017.

VINCENT M, MICAH CB. Dioxo-bicyclo[3.2.1.]Octane-2,3,4-triol derivatives. EP; EP 2334687 B1. Disponível em <<https://lens.org/128-284-146-221-025>>, 2012.

VILAR, S., HARPAZ, R., URIARTE, E., SANTANA, L., RABADAN, R.; FRIEDMAN, C. Drug-drug interaction through molecular structure similarity analysis. **Journal of the American Medical Informatics Association**, 19(6), 1066–1074. 2012.

VLADIMIR, G.; ALT, I.; SEHLKE, R., LOBLEY, A.; BAUMGÄRTLER, C.; STULIC; M., HACKNER, K.; DZURILLOVA, L.; PETRU, E.; HADJARI, L.; LAFLEUR, J.; SINGER, J.; KRALL, N.; ŠUFLIARSKY, J.; HEFLER, L.; FUEREDER, T.; TAUBERT, C.; BOUDESCO, C.; PAYNE, A. 23P Enriching for response: Patient selection criteria for A2AR inhibition by EXS-21546 through ex vivo modelling in primary patient material. **Immuno-Oncology Technology**, 16, 100128. 2022.

WANG, Z., LI, S., LI, Q., WANG, W., LIU, M., YANG, S., ZHANG, L., YANG, D., DU, G., LU, Y. A Novel Cocrystal of Daidzein with Piperazine to Optimize the Solubility, Permeability and Bioavailability of Daidzein. **Molecules**, 29(8), 1710. 2024.

WATERHOUSE A., BERTONI M., BIENERT S., STUDER G., TAURIELLO G., GUMIENNY R., HEER F.T., DE BEER T.A.P., REMPFER C., BORDOLI L., LEPORE R., SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modeling of protein structures and complexes, **Nucleic Acids Res.** 46 W296–W303, 2018.

WALSH, R. D. B., BRADNER, M. W., FLEISCHMAN, S., MORALES, L. A., MOULTON, B., RODRÍGUEZ-HORNEDO, N., & ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. **Chemical Communications**, (2), 186–187. 2002.

WANG, C., PERUMALLA, S. R., LU, R., FANG, J., SUN, C. C. Sweet Berberine. **Crystal Growth & Design**, 16(2), 933–939. 2015.

WNENDT, S.; FINKAM, M.; WINTER, W.; OSSIG, J.; RAABE, G.; ZWINGENBERGER, K. Enantioselective inhibition of TNF-alpha release by thalidomide and thalidomide-analogues. **Chirality**. v 8(5), p 390-6, 1996.

WU E.L.; CHENG X.; JO S.; RUI H.; SONG K.C.; DÁVILA-CONTRERAS E.M.; QI Y.; LEE J.; MONJE-GALVAN V.; VENABLE R.M.; KLAUDA J.B.; IM W.. CHARMM-GUI Membrane Builder Toward Realistic Biological Membrane Simulations. **J. Comput. Chem.** 35:1997-2004. 2014.

WU, H.; DONG Z.; LI, H.; KHAN, M. An Integrated Process Analytical Technology (PAT) Approach for Pharmaceutical Crystallization Process Understanding to Ensure Product Quality and Safety: FDA Scientist's Perspective. **Organic Process Research & Development**. v. 19(1), p. 89-101. 2015.

WU, Z., CHEN, S., WANG, Y., LI, F., XU, H., LI, M., ZENG, Y., WU, Z., GAO, Y. Current perspectives and trend of computer-aided drug design: a review and bibliometric analysis. **International Journal of Surgery**. 2024.

XU D., ZHANG Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization, **Biophys. J.** 101 2525–2534. 2011.

YANG, D., CAO, J., JIAO, L., YANG, S., ZHANG, L., LU, Y., DU, G. Solubility and Stability Advantages of a New Cocrystal of Berberine Chloride with Fumaric Acid. **ACS Omega**, 5(14), 8283–8292. 2020.

YANG, J., LIN, X., XING, N., ZHANG, Z., ZHANG, H., WU, H., XUE, W. Structure-Based discovery of novel nonpeptide inhibitors targeting SARS-COV-2 MPRO. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 61(8), 3917–3926. 2021.

YAO, X.; HENRY, R. F.; ZHANG, G. G. Ritonavir Form III: a new polymorph after 24 years. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 112(1), 237–242. 2022.

YU, Q.; WANG, X.; LI, X.; BAI, X.; ZHAO, R.; PENG, X. Purinergic P2X7R as a potential target for pancreatic cancer. **Clinical & Translational Oncology**. 25(8), 2297–2305. 2023.

ZENI, C., PINSLER, R., ZÜGNER, D., FOWLER, A., HORTON, M., FU, X., SHYSHEYA, S., CRABBÉ, J., SUN, L., SMITH, J., NGUYEN, B., SCHULZ, H., LEWIS, S., HUANG, C., LU, Z., ZHOU, Y., YANG, H., HAO, H., LI, J., . . . XIE, T. MatterGen: a generative model for inorganic materials design. **arXiv.org**. 2023.

ZHENG W., ZHANG C., WUYUN Q., PEARCE R., LI Y., ZHANG Y. LOMETS2: improved meta-threading server for fold-recognition and structure-based function annotation for distant-homology proteins, **Nucleic Acids Res.** 47, W429–W436. 2019.

ZHU, B., ZHANG, Q., WANG, J., MEI, X. Cocrystals of Baicalein with Higher Solubility and Enhanced Bioavailability. **Crystal Growth & Design**, 17(4), 1893–1901. 2017.

8 APÊNDICES E ANEXOS

8.1 APÊNDICES

8.1.1 ARTIGOS PUBLICADOS

A primeira etapa do projeto foi publicada na revista *Computers in Biology and Medicine*, evidenciando a descoberta dos potenciais inibidores do P2X7R:

BELLO, M. L., MENDES, G. E. M., SILVA, A. C. R., FARIA, R. X. Virtual screening indicates potential inhibitors of the P2X7 receptor. **Computers in Biology and Medicine**, 164, 107299. 2023.

Ao longo do desenvolvimento do projeto outro artigo foi publicado, sendo esse à revista *Molecular Graphics and Modelling*, voltado ao entendimento conformacional e molecular da proteína AMPK:

MENDES, G. E. M., MAIO, A. R., DA SILVA RODRIGUES DE OLIVEIRA, G., ROSA, L. C., DE CARVALHO COSTA, L., DE OLIVEIRA, L. C. V., DE FREITAS, M. S., SILVA, R. C. E., GALVAO, R. M. D. S., COUTINHO, R. C., SANTOS, T. C. R., DE SOUZA CARVALHO, T., DE SOUZA LIMA, V. H., BELLO, M. L. Biomolecular Conformational Changes and Transient Druggable Binding Sites through Full-Length AMPK Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. 109039. 2025.