

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos

**Estudos *in vitro* e *in silico* do mecanismo de ação vasorrelaxante
da amida sintética (*E*)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida
(MFTA) em aorta de rato**

Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva

João Pessoa-PB
2022

Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva

Estudos *in vitro* e *in silico* do mecanismo de ação vasorrelaxante da amida sintética (*E*)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA) em aorta de rato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

João Pessoa-PB

2022

Ata da 466ª (quadringentésima sexagésima sexta) Dissertação de Mestrado do aluno do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva**, candidato ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e oito de setembro do ano de dois mil e vinte e dois (28/09/2022), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, Link: <https://meet.google.com/uew-keub-xiq>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o aluno **Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva**, candidato ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Bárbara Viviana de Oliveira Santos, Ph.D em Farmacoquímica, Robson Cavalcante Veras, Ph.D em Farmacologia e Fabiana de Andrade Cavalcante, Ph.D em Farmacologia. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, a Presidente da Comissão, professora Fabiana de Andrade Cavalcante, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato **Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Estudos *in vitro* e *in silico* do mecanismo de ação vasorrelaxante da amida sintética (*E*)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA) em aorta de rato”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO. Em face da aprovação, declarou a Presidente achar-se o examinado **Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva** legalmente habilitado a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo discente.

Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
FABIANA DE ANDRADE CAVALCANTE OLIVEI
Data: 28/09/2022 17:25:55-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras (Examinador)

Documento assinado digitalmente
BARBARA VIVIANA DE OLIVEIRA SANTOS
Data: 28/09/2022 16:51:31-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos (Membro (Exar

Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva (Discente)

Documento assinado digitalmente
ANTONIO RAPHAEL LIMA DE FARIAS CAVAL
Data: 28/09/2022 17:29:59-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Documento assinado digitalmente
ROBSON CAVALCANTE VERAS
Data: 28/09/2022 17:04:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>



Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti.
Estudos in vitro e in silico do mecanismo de ação
vasorrelaxante da amida sintética
(E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida
(MFTA) em aorta de rato / Antônio Raphael Lima de
Farias Cavalcanti Silva. - João Pessoa, 2022.
110 f. : il.

Orientação: Fabiana de Andrade Cavalcante.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Amida. 2. Vasorrelaxante. 3.
(E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida. 4.
Docking molecular. I. Cavalcante, Fabiana de Andrade.
II. Título.

UFPB/BC

CDU 547-327(043)

Dedicatória

Aos meus pais, Givaldo Cavalcanti da Silva (*in memoriam*) e Maria José Lima de Farias pelo **infinito** amor dedicado a mim. Vocês abdicaram de tudo pela incontestável valorização dada a minha educação, prezando diariamente o ser pelo ter. Amo vocês.

Ao meu bem, minha amada esposa Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti, pelo carinho, afeto e amor que me são presenteados todos os dias. Pelas palavras sempre calmas e de paz. Meu porto seguro, te amo.

Ao meu irmão, quase filho, Lucas Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva, pelo amigo justo e forte que conquistei. Orgulho-me do homem que você é.

Agradecimentos

Nossa vida precisa de disciplina em várias searas, a disciplina da mente, do tempo, das posses, bem como a disciplina da posição. Esse último tipo requer de mim dar honra a quem é **devido honra**. *Devido* significa “que se deve, pagável”, logo não está acima do meu dever, mas é algo que deve acontecer. Já *honra* significa “alta consideração, reconhecimento de valor”. Diante disso, eu devo honra a algumas pessoas que nesta dissertação se fizeram presentes durante esses quase três anos:

Em primeiro lugar, eu devo honra a Deus, tudo que se consumou neste trabalho ocorreu com a permissão Dele. O Senhor é presente desde antes do meu desejo de aqui estar, de tudo sabes, e nada que aqui foi feito, foi sem a Tua permissão. Por isso Jesus, eu te entrego cada palavra que aqui está escrita e será falada, para a honra e glória do teu Santo nome. Obrigado por Tua mão sempre se estender como a mão de um pai que acalenta o filho, e te agradeço ainda mais por retirar as escamas dos meus olhos e assim perceber que nada aconteceu **por sorte ou privilégios pessoais**, por que eu não mereço, mas a Tua graça me alcançou.

À minha família, nas pessoas da minha esposa, minha mãe e meu irmão. Vocês são o meu maior tesouro, amo-os mais que qualquer coisa, daria minha vida por cada um de vocês. Sou grato porque não medem esforços pela nossa felicidade, porque valorizam esse núcleo social instituído por Deus, porque na aflição nos unimos de maneira inimaginável. Posso me confortar em coisas ou pessoas, mas ao pensar na perda de algum de vocês, sei que nada nem ninguém tem a capacidade de despender a mim tanto amor. Aqui deixo um conselho, amem os seus de todo coração, não existirá riqueza maior do que a sua família.

Aos meus tios Demilson e Geniete de Lima Araújo, que me receberam em seu lar, em 2013, quando iniciei o curso de Farmácia na Universidade Federal da Paraíba. Vocês me acolheram como um filho, dispuseram de tudo que eu precisava, do levantar ao deitar. Hoje esse trabalho se completa em virtude de pequenas conquistas, uma delas a graduação, a qual tiveram um papel fundamental. Nunca fui cobrado ou constrangido por chegar com as mãos vazias, pelo contrário, eu tinha os mesmos privilégios que seus filhos e meus primos, Iury e Mabelly de Lima Araújo possuíam. Obrigado por tudo que fizeram por mim durante quase 5 anos.

À minha orientadora, Fabiana de Andrade Cavalcante. Nosso caminho se cruzou na graduação, depois me tornei aluno de Iniciação Científica, em seguida o Trabalho de Conclusão de Curso e agora o Mestrado. Obrigado por ter estendido a mão todas as vezes que pedi. Decidi voltar por conta da sua personalidade compreensiva, apaziguadora e constante, tenho plena convicção que há linhas de pesquisas mais fáceis de desenvolver, mas antes de escolher o projeto eu escolhi a orientação. Tenho uma dificuldade em memorizar muitas coisas, e mesmo assim não se incomodava com perguntas “tolas”, repetidas e fora de horário. Muito obrigado por ter me orientado com tanta maestria e por ter um zelo especial com os seus, foi muito bom me sentir cuidado e protegido.

À professora Bagnólia Araújo. Mulher com uma história de vida semelhante a dos meus pais, de origem humilde, mas com muita garra e determinação. Parabéns pela sua oratória, é muito bom ouvir os seus momentos de fala. Obrigado por se incomodar com os detalhes, e pela dedicação no que se presta a fazer.

Ao professor Luiz Henrique que faz ponderações bem colocadas quando discute algo. Obrigado por cada questionamento.

À professora Luciana Scotti e à doutoranda Natália Fernandes. Vocês são referência de mansidão e paciência. Obrigado por cada contribuição dada no aspecto químico teórico desse trabalho, foi engrandecedor trabalhar e aprender com vocês.

Ao professor Luis Cesar Rodrigues e ao doutorando Luiz André Silva, que gentilmente cederam o composto teste para o desenvolvimento desse trabalho. Graças a (E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida, estamos devolvendo à ciência uma pequena contribuição do investimento feito pelas instituições de pesquisa.

Às duas pessoas que se tornaram muito especiais, Thayná Moura e Jayne Muniz. Duas alunas modelos de Iniciação Científica, incrivelmente espertas, vivas e comprometidas. Obrigado por terem se doado a esse projeto, tenho certeza que o futuro reserva bons caminhos profissionais para cada uma de vocês. Um forte abraço.

À mestrande Rayane Fernandes. Obrigado por ter me guiado no retorno ao laboratório, por cada experimento e resultado que se dedicou a estar comigo.

À doutoranda Indyra Alencar. Uma colega de turma de graduação que esteve em toda minha passagem pelo Laboratório de Farmacologia Funcional. Extremamente dedicada e inteligente, obrigado por ter me ajudado nos momentos de dúvida dos experimentos e apresentações.

À doutoranda Sarah Rebeca Ferreira. Uma das pessoas mais amáveis que conheço, obrigado por todas as animações e figuras cedidas.

Aos demais integrantes do Laboratório de Farmacologia Funcional. Alunos e alunas das mais diversas formações, com um rico compilado de conhecimento, obrigado por cada correção desse trabalho, por cada sugestão feita, vocês são diferentes dos demais, muito fruto da orientação das professoras Fabiana e Bagnólia, mas muito porque vocês decidiram encarar com vigor e determinação a pesquisa. Parabéns jovens!

A José Crispim Duarte. Um servidor público referência a ser seguido, sempre solícito com nossos pedidos de animais, um engenheiro sem anel para reparos e consertos no nosso laboratório. Obrigado pela parceria.

À professora Mirian Salvadori e a médica veterinária Roberta N. Parentoni por todo trabalho na condução da Unidade de Produção Animal (UPA) e pela disponibilidade de sempre.

Ao Sr. Luís C. Silva e a Adriano S. Cordeiro, pela competência e eficiência na realização do trabalho junto a UPA, sempre disponíveis.

À Mônica Rodrigues. Colaboradora da limpeza que se tornou nossa válvula de escape nas manhãs de experimento. Obrigado por sempre mostrar que o mundo é bom.

À Universidade Federal da Paraíba. Esta casa me acolheu por muitos anos e graças a ela tive a oportunidade de conseguir trabalho e através deste realizar sonhos. Falo com carinho e cheio de orgulho que sou filho desta instituição, meu muito obrigado a todos que a fazem.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), na pessoa do coordenador professor Marcelo Sobral da Silva e às secretárias Caroline Medeiros e Nilmar Níncia, por todo esforço destinado ao Programa.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por todo apoio financeiro, corporativo e pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

Ao PPgPNSB, pelo qual tive a oportunidade de me tornar mestre, a todos os professores que fazem parte da equipe, assim como todos os funcionários.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal, assim como, na produção dessa Dissertação de Mestrado.

Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva

“ Você não consegue ligar os pontos olhando para frente; você só consegue ligá-los olhando para trás. Então você tem que confiar que os pontos se ligarão algum dia no futuro. ”

Steve Jobs

RESUMO

(E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA) é uma amida tiofênica sintética, na qual o oxigênio do anel furano foi substituído pelo enxofre, formando um anel tiofeno, criando uma nova molécula. Diversas atividades de amidas foram relatadas no músculo liso, incluindo atividade vasorrelaxante em aorta de rato. Com o *docking* molecular é possível prever a melhor orientação de uma molécula para uma segunda, quando acopladas, formando um complexo. Considerando que a MFTA em trabalho anterior apresentou efeito espasmolítico não seletivo em modelos de músculo liso tônico e fásico, sendo mais potente em aorta de rato, decidiu-se caracterizar seu mecanismo de ação vasorrelaxante por meio de estudos *in vitro* e *in silico*. A aorta de ratos Wistar foi seccionada em anéis e suspensa em cubas de banho para órgãos isolados sob condições adequadas, e as contrações isométricas foram monitoradas. A MFTA foi submetida ao *docking* molecular (DM) no Molegro Virtual Docker v.6.0.1, utilizando-se o canal de cálcio dependente de voltagem (Ca_v) e a proteína cinase associada a Rho (ROCK) complexados com nifedipino e Y-27632, respectivamente, obtidos do *Protein Data Bank*, tomando como referência o valor energético dos algoritmos Moldock e Rerank score (kcal/mol). Todos os protocolos experimentais ($n = 5$) foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB (8073300419). A MFTA relaxou de maneira dependente da concentração e equipotente a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de fenilefrina, tanto na presença ($E_{\text{max}}=100\%$ e $\text{CE}_{50}=1,1 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M) quanto na ausência ($E_{\text{max}}=100\%$ e $\text{CE}_{50}=1,3 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ M) do endotélio, sugerindo que seu efeito vasorrelaxante parece ser devido a um mecanismo independente dos fatores relaxantes derivados do endotélio. Assim, decidiu-se avaliar a participação dos canais de K^+ e dos Ca_v no efeito vasorrelaxante da MFTA. Foi observado que a amida relaxou de maneira dependente de concentração a aorta pré-contraída com 30 ($E_{\text{max}}=95,4 \pm 4,6\%$ e $\text{CE}_{50}=1,9 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M) ou 80 mM ($E_{\text{max}}=98,7 \pm 1,3\%$ e $\text{CE}_{50}=8,3 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M) de KCl, sendo cerca de duas vezes mais potente quando esses anéis eram pré-contraídos com elevadas concentrações de KCl, indicando uma possível participação dos Ca_v . Essa hipótese foi confirmada pela observação de que a amida (10^{-5} - 3×10^{-4} M) inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio, com desvio da curva controle para direita e redução do E_{max} de 100% (controle) para $95,6 \pm 4,5$; $68,4 \pm 5,2$; $54,0 \pm 3,4$ e $19,4 \pm 3,5\%$, respectivamente. Os valores de CE_{50} do CaCl_2 passaram de $2,0 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M (controle), para $1,5 \pm 0,2 \times 10^{-3}$; $2,8 \pm 0,2 \times 10^{-3}$; $7,0 \pm 1,2 \times 10^{-3}$; $1,2 \pm 0,5 \times 10^{-4}$ M, respectivamente. Além disso, a MFTA relaxou de maneira dependente de concentração a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista dos Ca_v1 ($E_{\text{max}}=100\%$ e $\text{CE}_{50}=6,3 \pm 1,6 \times 10^{-5}$ M), indicando uma possível inibição do influxo de Ca^{2+} , através dos Ca_v1 . Também foi investigada a participação da via da ROCK e observou-se que não houve diferença na eficácia nem na potência relaxante da MFTA na presença de 10^{-6} M de Y-27632 ($E_{\text{max}}=100\%$ e $\text{CE}_{50}=5,4 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M), descartando a participação desta via no efeito vasorrelaxante *in vitro* da amida. Nos estudos *in silico*, pode-se comprovar os ensaios *in vitro* para o bloqueio dos Ca_v , evidenciado pelos valores energéticos mais negativos da MFTA (-132,99 e -111,60) quando comparados ao nifedipino (-81,77 e 122,98) para Moldock e Rerank score respectivamente. Para ROCK, os estudos *in silico* foram condizentes com os *in vitro* apenas na função Rerank score, uma vez que a MFTA (-60,64) não apresentou energia mais negativa que o Y-27632 (-73,35). Portanto, a MFTA possui efeito vasorrelaxante por bloquear Ca_v1 , de modo que o score mais negativo do valores energéticos no DM corrobora com a confirmação dessa hipótese.

Palavras-Chave: Amida; (E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida; vasorrelaxante; docking molecular.

ABSTRACT

(E)-N-(4-methoxyphenethyl)-3-(thiophen-2-yl)acrylamide (MFTA) is a synthetic thiophenic amide, in which the furan ring oxygen has been replaced by sulfur, forming a thiophene ring, creating a new molecule. Several amide activities have been reported in smooth muscle, including vasorelaxant activity in rat aorta. With molecular docking it is possible to predict the best orientation of one molecule to a second one, when they are coupled, forming a complex. Considering that MFTA in a previous work presented a non-selective spasmolytic effect in tonic and phasic smooth muscle models, being more potent in rat aorta, it was decided to characterize its vasorelaxant mechanism of action through *in vitro* and *in silico* studies. The aorta of Wistar rats was sectioned into rings and suspended in isolated organ baths under appropriate conditions, and isometric contractions were monitored. MFTA was subjected to molecular docking (MD) in Molegro Virtual Docker v.6.0.1, using voltage-gated calcium channel (Cav) and Rho-associated protein kinase (ROCK) complexed with nifedipine and Y-27632, respectively, obtained from the Protein Data Bank, having as reference the energy value of the Moldock and Rerank score algorithms (kcal/mol). All experimental protocols (n = 5) were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals at UFPB (8073300419). MFTA equipotently and concentration-dependently relaxed the rat aorta pre-contracted with 3×10^{-7} M phenylephrine, both in the presence ($E_{\max} = 100\%$ and $EC_{50} = 1.1 \pm 0.2 \times 10^{-4}$ M) and absence ($E_{\max} = 100\%$ and $EC_{50} = 1.3 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ M) of functional endothelium, suggesting that its vasorelaxant effect appears to be due to a mechanism independent of endothelium-derived relaxing factors. Thus, it was decided to evaluate the participation of K^+ and Cav channels in the vasorelaxant effect of MFTA. It was observed that the amide relaxed the pre-contracted aorta with 30 ($E_{\max} = 95.4 \pm 4.6\%$ and $EC_{50} = 1.9 \pm 0.2 \times 10^{-4}$ M) or 80 mM ($E_{\max} = 98.7 \pm 1.3\%$ and $EC_{50} = 8.3 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ M) of KCl, being about twice more potent when these rings were pre-contracted with high concentrations of KCl, indicating a possible participation of Cav. This hypothesis was confirmed by the observation that amide (10^{-5} – 3×10^{-4} M) inhibited in a concentration-dependent manner the contractions induced by $CaCl_2$ in depolarizing medium nominally without calcium, with shift of the control curve to the right and reduction of the E_{\max} from 100% (control) to 95.6 ± 4.5 ; 68.4 ± 5.2 ; 54.0 ± 3.4 and $19.4 \pm 3.5\%$, respectively. The EC_{50} values of $CaCl_2$ changed from $2.0 \pm 0.2 \times 10^{-3}$ M (control) to $1.5 \pm 0.2 \times 10^{-3}$; $2.8 \pm 0.2 \times 10^{-3}$; $7.0 \pm 1.2 \times 10^{-3}$; $1.2 \pm 0.5 \times 10^{-4}$ M, respectively. In addition, MFTA relaxed the pre-contracted aorta in a concentration-dependent manner with 3×10^{-7} M of S(-)-Bay K8644, a Cav1 agonist ($E_{\max} = 100\%$ and $EC_{50} = 6.3 \pm 1.6 \times 10^{-5}$ M), indicating a possible inhibition of Ca^{2+} influx through Cav1. The participation of the ROCK pathway was also investigated and it was observed that there was no difference in the efficacy or in the relaxing potency of MFTA in the presence of 10^{-6} M of Y-27632 ($E_{\max} = 100\%$ and $EC_{50} = 5.4 \pm 1.1 \times 10^{-5}$ M), discarding the participation of this pathway in the *in vitro* vasorelaxant effect of the amide. In silico studies, in vitro assays for blocking Cav can be confirmed, as evidenced by the more negative energetic values of MFTA (-132.99 and -111.60) when compared to nifedipine (-81.77 and 122.98) for Moldock and Rerank score respectively. For ROCK, in silico studies were consistent with in vitro studies only in the Rerank score function, since MFTA (-60.64) did not present more negative energy than Y-27632 (-73.35). Therefore, MFTA has a vasorelaxant effect by blocking Cav1, so that the most negative score of energy values in MD corroborates the confirmation of this hypothesis.

Key words: Amide; (E)-N-(4-methoxyphenethyl)-3-(thiophen-2-yl)acrylamide; vasorelaxant; molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular de amidas primárias, secundárias e terciárias.....	30
Figura 2 – Estrutura molecular da MFTA.....	31
Figura 3 – Reações químicas para síntese da MFTA.....	32
Figura 4 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa vascular pelo aumento da concentração extracelular de K^+	37
Figura 5 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa vascular pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ –PLC $\beta 1$	38
Figura 6 – Mecanismo de manutenção da contração no músculo liso vascular pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.....	40
Figura 7 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso vascular induzido pelas vias efectoras do cAMP e cGMP.....	43
Figura 8 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da MFTA em anéis de aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.....	58
Figura 9 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (A) e por 80 mM (B) de KCl em anéis de aorta de rato.....	61
Figura 10 – Registros originais representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$ na presença da MFTA nas concentrações de 10^{-5} (A); 3×10^{-5} (B); 10^{-4} (C) e 3×10^{-4} M (D) em anéis de aorta de rato.....	64
Figura 11 – Registro original representativo do efeito vasorrelaxante da MFTA em anéis de aorta de rato pré-contraídos com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644.....	67
Figura 12 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10^{-6} M de Y-27632 (B) em anéis de aorta de rato.....	70
Figura 13 – Interações 2D e 3D entre o composto (E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA) (A), o nifedipino (B) e o canal de cálcio dependente de voltagem.....	75
Figura 14 – Interações 2D e 3D entre o composto (E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA) (A), o Y-27632 (B) e a macromolécula ROCK-1.....	77
Figura 15 – Proposta de mecanismo de ação vasorrelaxante para MFTA em aorta de rato.....	91

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na presença (■) e na ausência (□) de endotélio funcional em anéis de aorta de rato.....59
- Gráfico 2** – Efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (●) e por 80 mM (○) de KCl em anéis de aorta de rato.....62
- Gráfico 3** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (\leftrightarrow) e na presença da MFTA nas concentrações 10^{-5} (▲), 3×10^{-5} (Δ), 10^{-4} (◆) e 3×10^{-4} (◇) M em anéis de aorta de rato.....65
- Gráfico 4** – Efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M S-(-)-Bay K8644 (*)......68
- Gráfico 5** – Efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença de 10^{-6} M de Y-27632 (▣) em anéis de aorta de rato.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo.....	54
Tabela 2 – Valores de energia de ligação da MFTA analisados nas duas proteínas selecionadas no estudo	73
Tabela 3 – Análise teórica <i>in silico</i> de toxicidade da MFTA.....	79
Tabela 4 – Análise teórica <i>in silico</i> de biodisponibilidade da MFTA.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_c	concentração de Ca ²⁺ citosólico
[K⁺]_e	concentração extracelular de potássio
AC	ciclase de adenilil
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
CaM	calmodulina
cAMP	monosfofato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca²⁺	íon cálcio
CE₅₀	concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CMLV	célula muscula lisa vascular
CPI-17	inibidor da fosfatase da miosina potencializado pela PKC
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
eNOS	sintase de óxido nítrico endotelial
FEN	fenilefrina
FRDE	fatores relaxantes derivados do endotélio
GDP	difosfato de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
IP₃	1,4,5 trisfosfato de inositol
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem

MFTA	(E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLC	cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
NCX	trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NO	óxido nítrico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PIP₂	4,5 bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKC	proteína cinase dependente de cálcio
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLC	fosfolipase C
PMCA	cálcio ATPase da membrana plasmática
PGI₂	prostaciclina
RhoA	proteína G monomérica da família Rho do tipo A
RhoGEF	fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA
RS	retículo endosarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
ROCK	proteína cinase associada a Rho
SERCA	cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UPA	Unidade de Produção animal

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	24
2 Fundamentação teórica.....	27
2.1 Produtos naturais e sintéticos Bioativos.....	27
2.2 Amidas.....	29
2.3 <i>Docking</i> molecular e estudos <i>in silico</i> no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos.....	32
2.4 Músculo liso.....	35
3 Objetivos.....	45
3.1 Objetivo geral.....	45
3.2 Objetivos específicos.....	45
4 Material e métodos.....	47
4.1 Material.....	47
4.1.2 Produto-teste.....	47
4.1.3 Animais.....	47
4.1.4 Substâncias e reagentes.....	47
4.1.5 Soluções nutritivas.....	48
4.1.5.1 Solução de Krebs normal (mM)	48
4.1.5.2 Solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl (mM)	48
4.1.5.3 Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl (mM)	48
4.1.5.4 Solução de Krebs despolarizante nominalmente sem cálcio (mM)	48
4.1.6 Preparação das soluções-estoque da MFTA para os ensaios farmacológicos.....	48
4.1.7 Aparelhos.....	49
4.2 Métodos.....	49
4.2.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta de rato com e sem endotélio funcional.....	49
4.2.2 Avaliação da participação dos canais de potássio ou de cálcio dependente de voltagem no mecanismo vasorrelaxante da MFTA em aorta de rato.....	50
4.2.2.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou por 80 mM de KCl.....	50
4.2.2.2 Efeito da MFTA frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	51

4.2.2.3 Efeito da MFTA sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644.....	51
4.2.3 Avaliação da participação da RhoA/Rho cinase no mecanismo vasorrelaxante da MFTA em aorta de rato.....	51
4.2.3.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de Y-27632.....	52
4.2.4 Estudos <i>in silico</i> com a MFTA.....	52
4.2.4.1 <i>Docking</i> molecular da MFTA.....	52
4.2.4.2 Cálculo de acoplamento molecular e visualização das interações.....	54
4.2.5 Análise teórica <i>in silico</i> de toxicidade e biodisponibilidade para a MFTA.....	54
4.3 Análise estatística.....	55
5 Resultados.....	57
5.1. Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta de rato com e sem endotélio funcional.....	57
5.2 Avaliação da participação dos canais de potássio ou de cálcio dependente de voltagem no mecanismo vasorrelaxante da MFTA em aorta de rato.....	60
5.2.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou por 80 mM de KCl.....	60
5.2.2 Efeito da MFTA frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	63
5.2.3 Efeito da MFTA sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644.....	66
5.3 Avaliação da participação da RhoA/Rho cinase no mecanismo vasorrelaxante da MFTA.....	69
5.3.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença Y-27632.....	69
5.4 Estudos <i>in silico</i> com a MFTA.....	72
5.4.1 <i>Docking</i> molecular da MFTA.....	72
5.4.1.1 Avaliação da interação molecular entre a MFTA, o nifedipino e o Cav.....	72
5.4.1.2 Avaliação da interação molecular entre a MFTA, o Y-27632 e a ROCK.....	76
5.4.2 Análise teórica <i>in silico</i> de toxicidade e biodisponibilidade.....	78
6 Discussão.....	80
7 Conclusões.....	94
Referências.....	96
Anexos.....	111

Anexo 1.....	112
--------------	-----

1 Introdução

A revolução tecnológica determinou mudanças na estratégia de desenvolvimento de novos fármacos e, nesse contexto, destaca-se a síntese orgânica, a qual fez com que os produtos naturais passassem a competir em mercado com os compostos sintéticos (SANGI, 2016). A busca por princípios bioativos iniciou através da indústria farmacêutica, por meio de bioensaios, nos quais são identificados grupos farmacofóricos e realizadas modificações moleculares, com o objetivo de obter de novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Dessa forma, no contexto das substâncias sintéticas, destacam-se as amidas, compostos orgânicos derivados de ácidos carboxílicos por meio da substituição da hidroxila (-OH) pelo grupamento amino (-NH₂). As amidas podem ser classificadas como primárias, secundárias e terciárias, apresentando caráter polar e básico (USBERCO; SALVADOR, 2006; VALEUR; BRADLEY, 2009; ATKINS; JONES, 2012).

Amidas são estruturas encontradas em diversos fármacos sintéticos utilizados da medicina moderna. Esses fármacos são utilizados no tratamento de doenças que envolvam desordens na musculatura lisa. Dentre eles, podemos citar o lisinopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina), a valsartana (antagonista de receptores da angiotensina II) e o diltiazem (bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem) (VALEUR; BRADLEY, 2009). Além disso, já foi relatado que várias amidas naturais e sintéticas apresentam atividade sobre a reatividade de vários músculos lisos (SANTOS; CHAVES; SILVA, 1999; MEDEIROS, 2006; BRUNHOFER et al., 2008; BRUNHOFER et al., 2011; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2011; MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2018).

Outro grupamento químico que merece destaque é o anel tiofênico. Estudos anteriores, com fármacos que apresentam este grupamento, demonstraram atividade anti-inflamatória, analgésica, antipsicótica e anti-hipertensiva. Dentre essas substâncias, destaca-se o ácido tiaprofênico (ARACHCHIGE et al., 2021), a olanzapina (KANG et al., 2021) e o eprosartan (SALAMA, 2022).

A amida sintética tiofênica (*E*)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA), objeto de estudo deste trabalho, foi sintetizada pelo professor doutor Luiz Cesar Rodrigues e gentilmente cedida para experimentos farmacológicos na área de pesquisa não clínica com foco na musculatura lisa. A inspiração para a criação

do composto teste surgiu a partir de zantoxilamidas, amidas oriundas de plantas do gênero *Zanthoxylum* spp, que possuem em sua estrutura um anel furano. Através de reações químicas a MFTA foi sintetizada, na qual estruturalmente houve uma troca do oxigênio pelo enxofre no anel cíclico, dando origem a um anel tiofeno.

Recentemente, foi realizada uma triagem farmacológica em músculos lisos (fásico e tônico), onde foi evidenciado que a MFTA apresentou atividade espasmolítica não seletiva em relação aos órgãos e agentes contráteis testados, sendo mais eficaz em aorta de rato comparado ao seu efeito em útero de rata (MOURA; CAVALCANTE, 2020).

O músculo liso é principal tipo de músculo que controla a maioria dos sistemas de órgãos ociosos do corpo (SILVERTHORN, 2017). Dentre as desordens que acometem esse sistema, as vasculares, são classificadas como a principal causa de morte no mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2020). Além disso, no Brasil, a hipertensão é responsável por 34 mortes por hora no Brasil, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2019).

Uma metodologia que pode corroborar para o estudo de substâncias com ação na musculatura lisa é o *docking* molecular (DM), que prediz a melhor orientação de uma molécula a uma segunda, quando estas estão acopladas entre si, formando um complexo (LENGAUER; RAREY, 1996) de maneira sucinta nesse processo, são utilizadas representações estruturais próximas da realidade por meio de uma série de cálculos, usando-se da química teórica como instrumento matemático e a computação gráfica para o manuseio de modelos obtidos (BIELSKA et al., 2011). No processo de química teórica ocorre a análise conformacional de sistemas complexos, tendo como exemplo clássico o estudo de interação entre fármaco e proteína (MILLER, 2012).

Baseado nessas premissas, nota-se a importância em pesquisar um tratamento para desordens da musculatura lisa vascular, portanto, caracterizar em nível funcional, o mecanismo de ação da MFTA em aorta torácica de rato tem grande relevância de cunho científico. Além disso, poder prever a interação entre essa amida e o provável alvo de ligação, por meio de um estudo de *docking* molecular, bem como, por meio de uma análise, *in silico*, de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos, deixam o trabalho com uma maior robustez.

2 Fundamentação teórica

2.1 Produtos naturais e sintéticos bioativos

Os produtos naturais são amplamente utilizados na atual farmacopeia, fornecendo um vasto arsenal terapêutico contra inúmeras doenças, desde as mais simples até as mais complexas, compreendendo assim uma fonte de inestimável valor às necessidades medicinais da humanidade (KINGSTON, 2011; ATANASOV et al., 2015; TINTORE; VIDAL-JORDANA; SASTRE-GARRIGA, 2019). A natureza é a protagonista na produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, sendo o reino vegetal responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura, sendo, portanto, procurada na busca por potenciais efeitos terapêuticos (VIEGAS-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; SCHMIDT et al., 2008; LI; WENG, 2017).

Os químicos estudam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopeias da época, limitando-se ao isolamento e a determinação estrutural de substâncias ativas. Dada a importância das plantas medicinais, a química e a medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos. Desta forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje aos medicamentos e servindo de fonte de inspiração para o desenvolvimento de novas moléculas através da química medicinal (YUNES; CECHINEL, 2001; TU, 2011).

A procura por novos fármacos a partir de fontes naturais é uma atividade realizada há muito tempo pelas antigas populações, tendo grande contribuição para a farmacoterapia de várias doenças (BARREIRO; FRAGA; LIMA, 2012). Existem vários exemplos do uso de produtos naturais na terapêutica e, estes são fonte de novos padrões estruturais que representam uma inspiração química-molecular para elaboração de novos medicamentos (KERSTEN; WENG, 2018).

No entanto, produtos naturais também apresentam desafios para a descoberta de medicamentos, como barreiras técnicas e financeiras para triagem, isolamento, caracterização e otimização, o que contribuiu para um declínio em sua busca pela indústria farmacêutica a partir da década de 1990. Nos últimos anos, diversos avanços tecnológicos e científicos vêm crescendo na área farmacêutica, como ferramentas analíticas aprimoradas, estudo de genoma e engenharia,

estratégias e avanços na cultura microbiana, bem como a síntese química de novos compostos, fazendo surgir uma alternativa moderna na produção e descoberta de novos medicamentos (ATANASOV et al., 2021).

O meio mais comum de acesso a produtos naturais em grande escala tem sido através de semissíntese. O uso da bioengenharia e da química sintética permitiram que verdadeiramente substâncias fossem comercializadas a preços razoáveis em termos de custo (NEWMAN, 2016), exemplos da literatura incluem processo de geração da artemisinina, um antimalárico, pela Sanofi® e do paclitaxel, usado no tratamento de câncer de pulmão, pela Bristol-Myers Squibb® (RAVINA, 2011; TURCONI et al 2014). Além disso, a fermentação microbiana de produtos naturais alimentou uma indústria análoga, onde β -lactâmicos macrolídeos foram descobertos, desenvolvidos e comercializados desta forma (SEIPLE et al., 2016).

Os métodos semissintéticos são eficazes, porém há situações que essas ferramentas não são aplicáveis. Se um intermediário avançado não puder ser proveniente da natureza, ou se estudos anteriores identificaram análogos estruturais que não são acessíveis, resta como opção a síntese total. Os métodos de síntese estão sendo constantemente refinados e expandidos, oferecendo novas maneiras de resolver problemas complexos (TYLER; FRANCESCO; PATRICK, 2017).

Deste modo a química medicinal passou por vários momentos: a descoberta de fármacos ao acaso, observações empíricas, extrações de fontes naturais, semissínteses, até chegar a era das grandes sínteses (FUKUSHIMA et al., 2022). O ácido acetilsalicílico foi o pioneiro dos fármacos sintéticos, e o seu descobrimento marcou o final de um período, no qual a busca por substâncias naturais terapeuticamente úteis era feita ao acaso (BARREIRO; FRAGA, 2001).

A síntese química não serve apenas para criar novos compostos, mas abre caminho para confirmar e comparar estruturas moleculares, bem como dá a oportunidade de modificação estrutural de moléculas já existentes para uma otimização racional (GEN; MINGLIANG; XIANGBING, 2022).

Outra descoberta e desenvolvimento de uma rota sintética ocorreu para a eribulina, um agente anticancerígeno, da classe das halicondrinas, análogo sintético estruturalmente simplificado de produtos naturais oriundos de esponjas marinhas. O produto natural originário apresentava rendimento insuficiente para a

comercialização, síntese onerosa, além disso, o seu caminho sintético foi muito mais complexo do que qualquer outro medicamento já comercializado (YU; ZHENG; SELETSKY, 2013).

Os primeiros estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica para o planejamento racional de moléculas bioativas ganhou destaque durante a segunda guerra mundial. A pesquisa militar foi responsável por grandes avanços na química sintética, motivada pela necessidade de tratamento de infecções, da dor, de processos alérgicos e da depressão (YUNES; CECHINEL, 2001).

Dessa forma, a busca por novas substâncias químicas bioativas pelos laboratórios de pesquisa observou a utilização de novas técnicas para se obter maior número de compostos. Resumidamente, as reações químicas passaram a ser realizadas em multi-etapas, utilizando-se de pouquíssimos reagentes. O resultado dessas reações são produtos oriundos de combinações dos reagentes e, portanto, um número muito grande de compostos novos pode ser gerado (AMARAL et al., 2003; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

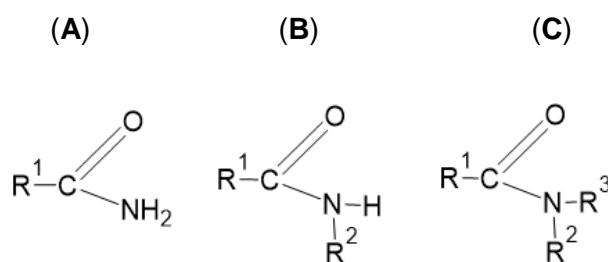
Em paralelo, surgiu o desenvolvimento de métodos de triagem biológica automatizada, a qual possibilitou a avaliação *in vitro* de inúmeras substâncias por experimento. Estas técnicas, empregadas concomitantemente, permitem a identificação de novos compostos capazes de interagirem com os alvos terapêuticos. A gênese de novas tecnologias possibilitou uma concepção mais ampla da química medicinal, aumentando a sua característica de interdisciplinaridade, dedicando-se à compreensão das razões moleculares da ação dos fármacos, da relação entre estrutura química e atividade farmacológica dos mesmos, considerando fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que possam ser representados por propriedades farmacoterapeuticamente úteis e, portanto, representem um novo protótipo, candidato efetivo a um novo fármaco (BARREIRO; FRAGA, 2001).

2.2 Amidas

Dentre os compostos sintéticos produzidos, destacam-se as amidas, as quais são substâncias derivadas de ácidos carboxílicos pela substituição da

hidroxila (-OH) pelo grupamento amino (-NH₂). De modo semelhante as aminas, que podem ter sua classificação de acordo com o número de substituintes de hidrogênio em primárias, secundárias ou terciárias (Figura 1), as amidas recebem a classificação mono ou dissustituídas (MCMURRY, 2016). Em sua estrutura, o grupo carbonila está ligado a um átomo de nitrogênio, que por sua vez, liga-se a hidrogênios e/ou grupos alquila (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018).

Figura 1 – Estrutura molecular de amidas primárias (A), secundárias (B) e terciárias (C).



Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

Esses compostos têm como duas características principais: a alcalinidade e a polaridade, características estas que permitem a solubilidade desses compostos em água (H₂O), em função das ligações de hidrogênio realizadas com as moléculas de H₂O. Essas ligações influenciam nas propriedades físicas, de modo que amidas primárias, por exemplo, apresentam altos pontos de ebulição e fusão, o que predispõe a formação de compostos sólidos em temperatura ambiente, visto que as interações entre as moléculas se tornam mais fortes em razão dessas ligações. Em contrapartida, as amidas terciárias não têm a capacidade de formar ligações de hidrogênio, logo possuem pontos ebulição e de fusão mais baixos (ATKINS, 2012).

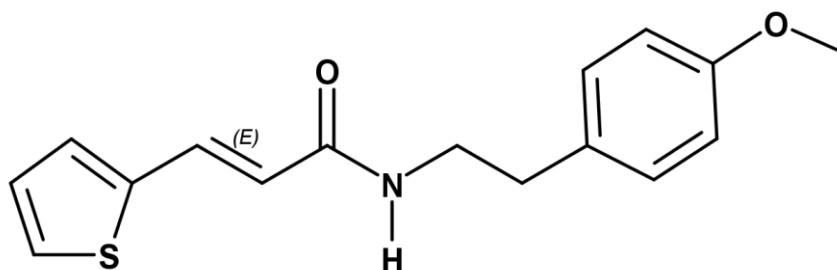
As amidas são compostos químicos encontrados em abundância na natureza, especialmente na composição estrutural de proteínas, bem como em polímeros biológicos e sintéticos, inclusive em medicamentos (MARQUES, 2018). Baseado nestes aspectos, diversas metodologias são descritas na literatura para síntese de amidas, como: reações de aminas com haletos de acila, com anidridos, com ésteres, com monóxidos de alcenos, com cetonas, rearranjo de aldoximas e hidrólise de nitrilas (KIM et al., 2009).

Algumas atividades farmacológicas já foram descritas para diversas amidas tais como: antiplaquetária (PARK, 2009), citotóxica em células tumorais (NAWWAR et al., 2013), hipoglicemiante e hipotensiva (AMARO et al., 2014).

Além disso, várias amidas apresentaram atividades farmacológicas sobre a musculatura lisa, por exemplo a *N*-(4,6-dimetil-2-piridinil) benzamida, a qual apresentou efeito inibitório frente às contrações induzidas por BaCl₂ em útero de ratas grávidas, e seu mecanismo de ação tocolítica foi descrito através da inibição da via das ciclooxygenases (ROBERT-PIESSARD et al., 1990); *N*-(4-metiltiofenil)-3,5-difluorobenzamida (BRUNHOFER et al., 2008) e a *N*-(2,4,6-trifluorofenil)-3,5-dinitrobenzotioamida (BRUNHOFER et al., 2011), que apresentaram atividade espasmolítica não seletiva em íleo de cobaia, por uma possível ativação dos canais de potássio ou bloqueio de canais de cálcio, respectivamente, bem como, amidas isoladas de *Piper tuberculatum* Jacq., como a piperina e piperdardina com efeito vasorrelaxante em aorta de rato (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2011), e a piplartina com atividade vasorrelaxante em aorta de rato (SILVA, 2009) e tocolítica útero de rata (MEDEIROS, 2006), todos por inibição do influxo de cálcio através dos Ca_v.

O composto em estudo, (*E*)-*N*-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA), é uma amida tiofência sintética (Figura 2) e foi obtida a partir do aldeído tiofênico, o qual foi tratado com fosfoacetado de etila, através da reação de Wittig, obtendo assim o éster tiofênico, que foi hidrolisado em solução de hidróxido de sódio, para gerar o ácido correspondente. Este, por sua vez, foi submetido a uma aminólise com 2-feniletanamina monometoxilada, resultando na amida MFTA (Figura 3).

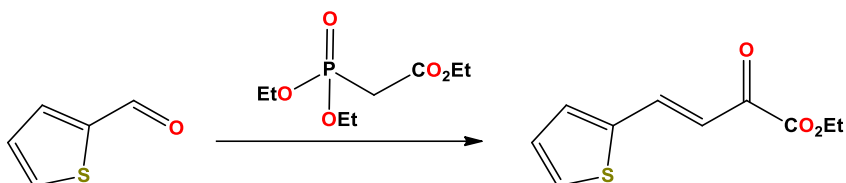
Figura 2 – Estrutura molecular da MFTA.



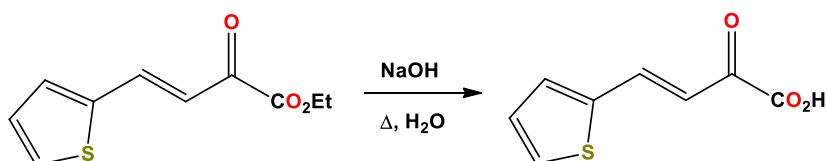
Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

Figura 3 – Reações químicas para síntese da MFTA.

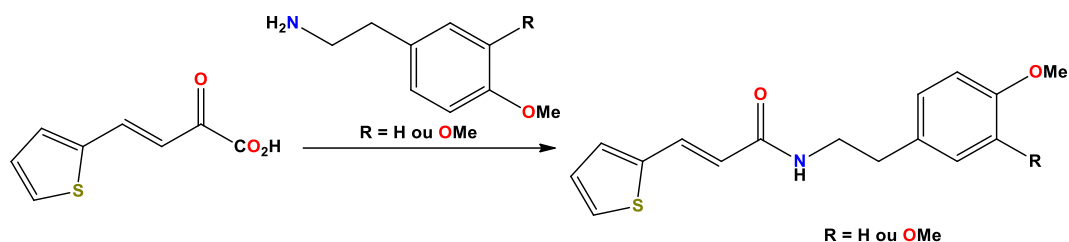
A



B



C



(A) Reação de Wittig (B) Hidrólise básica (C) Aminólise com amina correspondente.

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

2.3 *Docking* molecular e estudos *in silico* no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos

Boa parte dos compostos orgânicos são moléculas bioativas que desempenham seu efeito terapêutico por meio de interações específicas com um alvo específico. Metodologias computacionais viabilizaram a determinação quantitativa e qualitativa das distintas subunidades estruturais dos fármacos. Além disso, fatores farmacocinéticos, farmacodinâmicos, entre outros, dos candidatos a novos fármacos podem ser simulados virtualmente através de ferramentas computacionais modernas. Percebe-se que a informática passou a ser aliada inseparável da química medicinal, especialmente através da química computacional que permite estudos de modelagem e dinâmica molecular. Desta

forma, podem-se planejar ou predizer virtualmente candidatos a novos ligantes de determinados sítios receptores, em três dimensões (3D), através da construção de mapas farmacofóricos (KROGSGAARDLARSEN; LILILJEFORS; MADSEN, 1996; YANG et al., 2018).

Os estudos preliminares de novos compostos com potencial bioatividade seguiam um processo tradicional, que consiste em testes de atividades, realizados através de diversos ensaios biológicos de triagem *in vivo*. Os compostos promissores são elencados e suas características de metabolismo, farmacocinética, farmacodinâmica e potencial citotóxico são estudadas após à sua atividade (NORINDER; BERSTROM, 2006).

No início dos anos 80, ocorreu um grande avanço nas áreas da química combinatória e da robótica, tornando possível a síntese de quimiotecas de compostos a partir de uma mesma reação química, e da triagem utilizando ensaios *in vitro* em larga escala, o que possibilitou a investigação da atividade destas substâncias por meio de ensaios baseados em interações ligantes-biomacromolécula alvo (JÓNSDÓTTIR; JORGENSEN; BRUNAK, 2005).

Toda essa tecnologia engrenou o processo de descoberta de novos fármacos permitindo a síntese e a triagem de grandes conjuntos em compostos num pequeno intervalo temporal. Em contrapartida, esses esforços não surtiram efeitos no aumento do número de novos fármacos introduzidos no mercado, além do que muitos novos compostos sequer chegaram aos testes pré-clínicos. O principal gargalo encontra-se em deficiências na farmacocinética em decorrência da agregação, solubilidade, absorção bem como problemas de toxicidade, dificultando assim a aplicação farmacológica (SONG; LIMAND; TONG 2009; GHALEB et al., 2019),

As grandes indústrias farmacêuticas passaram a determinar a potência dos compostos de maneira concomitante as suas propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, além de propriedades toxicológicas, delineando assim um perfil integral para a seleção de um candidato a fármaco, corroborando na redução de fracassos e um aumento no desenvolvimento bem-sucedido de novas moléculas (SONG; LIMAND; TONG 2009; PARTHASARATHI, DHAWAN., 2018).

O processo de descoberta e desenvolvimento de novas entidades químicas é responsável por consumir investimentos na área de Pesquisa e Desenvolvimento na casa de milhões de dólares, mas acima de tudo há um consumo de tempo que envolve anos de trabalho com equipes multidisciplinares. A projeção é que seja gasto cerca de 500 milhões a 1 bilhão de dólares e mais ou menos 15 anos, desde o início de um projeto até a fase final da pesquisa clínica (WERMUTH, 2003; LOMBARDINO, LOWE III, 2004; FEE, 2007).

A fim de conseguir as exigências produtivas determinadas pelos altos níveis de investimento em pesquisa e desenvolvimento de fármacos, boa parte das indústrias mundiais adotaram como uma das principais estratégias o investimento em novas tecnologias e inovação para descoberta de novos compostos, com o foco na realização de testes de triagem de maneira mais racional, minimizando os gargalos de custos e tempo. Nesse caminho mais racional, as quimiotecas virtuais são avaliadas por meio de diferentes modelos computacionais (*in silico*), como por exemplo os testes de *docking* molecular, aumentando as chances de identificação de novos compostos com propriedades adequadas (YAMASHITA; HASHIDA, 2004; SOMANI et al., 2017; BLAKEMORE et al., 2018).

Nos estudos de *docking* molecular ocorre análise das interações entre os ligantes e as proteínas alvos (FERREIRA, 2015). Essa abordagem computacional utiliza a estrutura 3D do alvo biológico, que pode ser encontrada em bancos de dados de proteínas, como o *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN, 2000). A estrutura proteica, então, é submetida a encaixes, para determinado composto químico no local da ligação. Este complexo formado pode ser caracterizado pela especificidade de um composto ou pela preferência e afinidade de um ligante (RUYCK, 2016).

De forma resumida, o processo de *docking* molecular pode ser dividido em duas etapas, a função de busca, que realiza investigação e prediz a conformação do ligante em seu sítio de ligação, e a função de ranqueamento ou função de *scoring*, que pode predizer a afinidade do complexo alvo-ligante (TORRES et al., 2019).

Os estudos *in silico* são uma alternativa para o desenvolvimento de medicamentos com potencial terapêutico, para isso a molécula deve apresentar atividade biológica específica e boa biodisponibilidade. Os parâmetros farmacocinéticos, absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), podem

ser preditos por modelos computacionais reduzindo gargalos nas fases clínicas de desenvolvimento de medicamentos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Vale destacar que as previsões *in silico* não são formas substitutivas, nem desqualificam outros testes experimentais, como estudos *in vivo*. Muito pelo contrário, o objetivo principal é trabalhar em conjunto com estes, portanto uma valiosa característica dos estudos *in silico* é a possibilidade de servir como artifício de decisão, concomitante com outras evidências de cunho científico (VALERIO, 2009).

2.4 Músculo liso

O músculo liso é uma estrutura que reveste as paredes de muitos órgãos ocos, tendo uma morfologia e uma funcionalidade bem diversa, refletindo as necessidades contráteis especializadas das vias aéreas, do trato geniturinário, do trato gastrointestinal e dos vasos sanguíneos, de modo que anormalidades no processo da contratilidade das células musculares lisas podem ocasionar desregulações ou doenças como asma, cólicas intestinais e uterinas, disfunção erétil, incontinência urinária, diarreia e hipertensão arterial. Sendo assim, o modelo experimental de músculo liso tem grande relevância na busca e pesquisa por novas substâncias com finalidade terapêutica, que possam vir a normalizar os parâmetros fisiológicos e, conseqüentemente, o bem-estar do homem (WEBB, 2003; WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005; ANJOS et al., 2021).

Uma gama de sinais extracelulares, como processos neurais, humorais, iônicos e mecânicos, desencadeia a contração e o relaxamento do músculo liso vascular. O equilíbrio dinâmico entre os sinais de relaxamento e contração determina o tônus intrínseco desta musculatura lisa, que por sua vez, regula o dinamismo sanguíneo no interior do sistema vascular (WOODRUM; BROPHY, 2001; MORGADO et al., 2012)

Na musculatura lisa vascular o aumento da concentração de Ca^{2+} citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) é o gatilho necessário para iniciar o funcionamento de sua maquinaria contrátil (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Em condições fisiológicas, o aumento do Ca^{2+} citosólico inicia-se por meio de dois mecanismos.

Preliminarmente, pode-se citar o mecanismo de contração pelo acoplamento eletromecânico (Figura 4), no qual ocorre uma despolarização de membrana, através de uma mudança no potencial perimembranar, por meio de processos como a diminuição do gradiente eletroquímico de correntes de potássio para fora da célula e/ou ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) na membrana plasmática. O segundo tipo de acoplamento de contração é chamado de farmacomecânico (Figura 5), que ocorre através de mecanismos independentes do potencial de membrana, como a ligação de um agonista contrátil ao seu receptor de superfície celular (SOMLYO; SOMLYO, 1968).

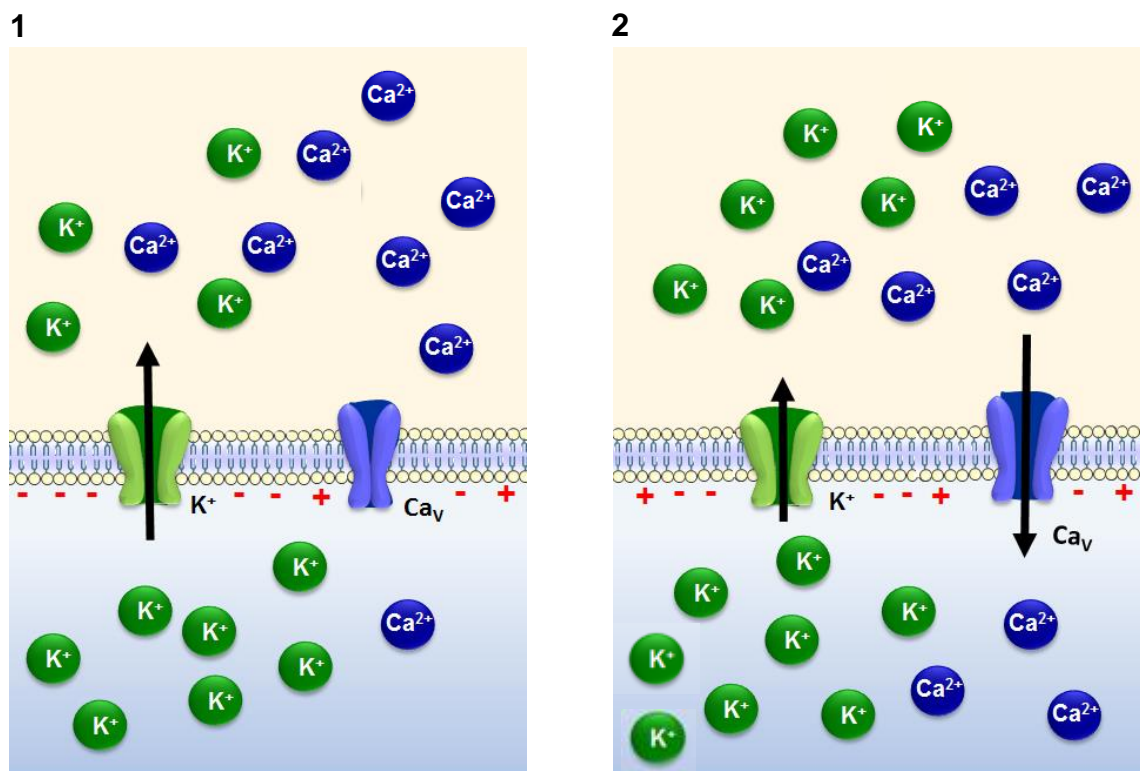
A ativação da via da enzima fosfolipase C $\beta 1$ (PLC- $\beta 1$) é considerada a principal forma de induzir o início do mecanismo de contração pelo acoplamento farmacomecânico. Essa ativação é resultado da interação de um agonista vasoconstritor, como a fenilefrina, e o receptor $\alpha 1$ transmembranar acoplado à proteína G (GPCR) heterotrimérica ($\text{G}_{q/11}$). A PLC- $\beta 1$ após sua ativação irá hidrolisar o fosfolípido de membrana 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), gerando a partir dessa reação enzimática produtos chamados de segundos mensageiros, especificamente o 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e o 1,2diacilglicerol (DAG) (MARIN et al., 1999).

No retículo sarcoplasmático estão localizados os receptores de IP_3 (IP_3R) e os receptores de rianodina (RyR) (NIXON; MIGNERY; SOMLYO, 1994; LESH et al., 1998). Os IP_3R são canais de cálcio ativados pelo IP_3 , a ativação destes receptores promove uma liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Este íon ativará os RyR , ativando-o, ocorrendo a liberação de mais íons cálcios no meio citosólico, processo este conhecido como “liberação de cálcio induzida por cálcio” (JORGENSEN et al., 1993).

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ é responsável pela ocupação de quatro sítios de ligação para o cálcio na proteína calmodulina (CaM), formando-se um complexo $4\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$, este por sua vez, irá ativar e consequentemente expor o domínio catalítico da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK irá fosforilar o resíduo Ser^{19} da cadeia leve de miosina, deixando-a apta para interagir com a actina, gerando as pontes cruzadas e, consequentemente, a contração (HARTSHORNE, 1987). Uma segunda enzima que pode ser ativada é a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que irá desfosforilar a cadeia leve da miosina,

promovendo o relaxamento. Dessa forma, o balanço entre a atividade da MLCK e da MLCP controla o estado de tensão muscular (MURTADA; HOLZAPFEL, 2014).

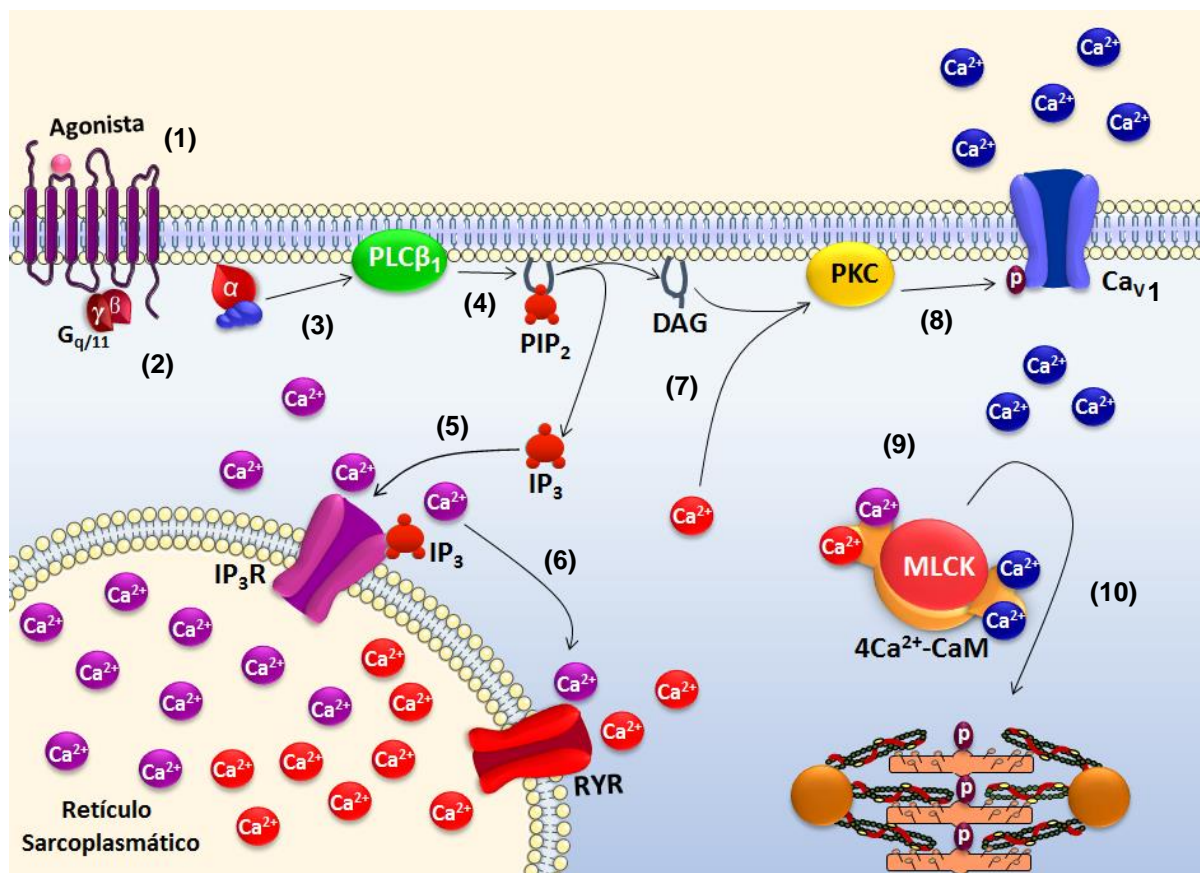
Figura 4 - Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa vascular pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



(1) Durante o repouso, o gradiente eletroquímico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; **(2)** um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos Ca_v que leva ao influxo de Ca^{2+} com consequente contração. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: FERREIRA, 2022.

Figura 5 - Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa vascular pela ativação do sistema efector $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) A subunidade $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima $PLC\beta_1$; (4) A $PLC\beta_1$ cliva o lipídio de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; (5) O IP_3 migra pelo citoplasma e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando o Ca^{2+} dos estoques; (6) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR , fazendo com que mais Ca^{2+} seja liberado para o citoplasma; (7) O Ca^{2+} que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; (8) A PKC ativada fosforila os Ca_v1 promovendo o influxo de Ca^{2+} através dos mesmos; (9) O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo $4Ca^{2+}$ - CaM e ativando a MLCK; (10) A MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: FERREIRA, 2022.

O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ também induz a translocação da proteína cinase dependente de cálcio (PKC) para a membrana plasmática, onde juntamente com o DAG será ativada. Uma vez ativa, a PKC irá fosforilar proteínas-alvos, no músculo liso em especial, os Ca_v , ativando-os e promovendo o influxo de Ca^{2+} , aumentando ainda mais a concentração deste íon no citosol, induzindo a contração do músculo

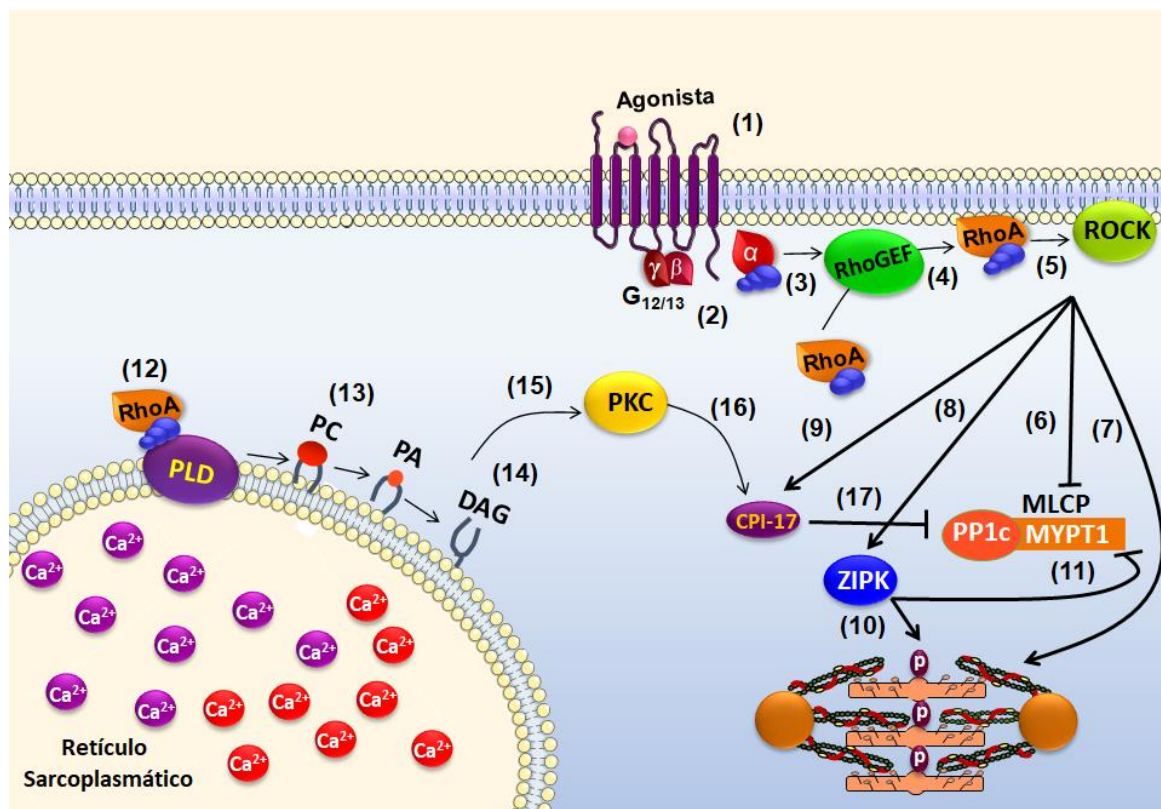
liso vascular (BERRIDGE, 2008). Esses canais consistem num complexo proteico hetero-oligomérico, compostos por uma subunidade $\alpha 1$ central, associada a subunidades auxiliares, β , $\alpha 2\delta$ e γ (LACINOVA, 2005). A $\alpha 1$ que se associa, por pontes de sulfeto, ao dímero $\alpha 2\delta$, é responsável por estabilizar e formar o poro do canal, já as subunidades β (intracelular) e γ (transmembranar) completam o canal estruturalmente (CATTERALL, 2021).

Os Ca_v são considerados como a maior via de influxo de cálcio em uma variedade de tipos celulares, incluindo as células musculares lisas, sendo então responsáveis por controlar diversos processos como a transcrição gênica e o acoplamento de excitação-contração (BARLOW et al., 2006). Podem ser divididos em 3 tipos: Ca_v1 ($\text{Ca}_v\text{-L}$), que se subdivide ainda em 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4, sendo o 1.2 majoritariamente expresso na musculatura lisa (AMBERG; NAVEDO, 2013). Os Ca_v2 ($\text{Ca}_v\text{-P/Q}$, N e R), que estão majoritariamente envolvidos na transmissão sináptica e também se subdividem em 2.1, 2.2 e 2.3. E por fim os Ca_v3 ($\text{Ca}_v\text{-T}$) que estão presentes majoritariamente em neurônios e se subdividem em 3.1, 3.2 e 3.3 (ZAMPONI et al., 2015; CATTERALL, 2021).

Outro mecanismo importante na fisiologia do acoplamento farmacomecânico ocorre por meio da modulação do aparelho contrátil através de vias de sinalização que alteram a atividade da MLCP (Figura 6). Esse mecanismo é descrito como via de sensibilização ao cálcio e se dá a partir da proteína G monomérica da família Rho do tipo A (RhoA) e o seu alvo proteína cinase associada à Rho (ROCK), ambas têm um papel crucial na regulação da atividade de diversos outros alvos celulares envolvidos no mecanismo de contração (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Os GPCRs acoplados a proteína $G_{12/13}$, quando ativados por agonistas contráteis levam a ativação direta ou indireta do fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA (RhoGEF), que ativa a RhoA, por trocar difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (GTP), formando a RhoA-GTP, deixando-a no estado ativado. RhoA-GTP irá se ligar ao seu alvo, a proteína ROCK, produzindo uma mudança conformacional no domínio cinase, ativando-o e causando uma autofosforilação (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROCK será responsável por induzir um aumento na sensibilidade ao cálcio, pela maquinaria contrátil, permitindo assim que o músculo permaneça num estado de contração (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Figura 6 – Mecanismo de manutenção da contração no músculo liso vascular pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{12/13}$ trocam GDP por GTP nas suas subunidades α (não mostrado da figura), tornando-se ativas; (3) A subunidade $\alpha_{12/13}$ -GTP ativa o RhoGEF; (4) O RhoGEF faz com que a RhoA troque GDP por GTP, sendo translocada para a membrana; (5) A RhoA-GTP ligada estimula a sua cinase ROCK; A ROCK possui vários alvos: (6) Inibe a MLCP; (7) Fosforila a MLC; (8) Ativa a ZIPK; (9) Ativa a CPI-17; (10) A ZIPK fosforila diretamente a MLC; (11) A ZIPK fosforila a MLCP, inibindo-a; (12) A RhoA-GTP ligada estimula a PLD; (13) A PLD cliva o lípido de membrana PC em PA; (14) O PA é desfosforilado para DAG pela ação da enzima fosfo-hidrolase; (15) O DAG ativa a PKC, de maneira sustentada; (16) A PKC fosforila a CPI-17, ativando-a; (17) A CPI-17 inibe a ação da MLCP. Todos esses mecanismos favorecem o estado fosforilado a MLC e sua interação com os filamentos de actina, mantendo o músculo liso contraído. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: FERREIRA, 2022.

Este processo acontecerá por meio de diversas outras etapas como a fosforilação da subunidade ligada a miosina (MYPT-1), da MLCP, resultando na inibição dessa enzima. Quando a MYPT-1 encontra-se fosforilada ocorre a inibição da MLCP, impedindo-se dessa forma a desfosforilação da cadeia leve da miosina, e então um aumento da sensibilidade ao cálcio pela maquinaria contrátil (WU; SOMLYO; SOMLYO, 1996)

A ROCK também pode ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+} , mais conhecida como proteína cinase de interação zíper (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto seu alvo principal é a MYPT1, a qual é fosforilada inibindo a ação da MLCP (MACDONALD et al., 2001; MURTHY, 2006).

Além disso, a ROCK ou a proteína cinase dependente de cálcio (PKC) podem fosforilar a proteína denominada inibidor da fosfatase da miosina potencializado pela PKC (CPI-17), que sofrerá uma mudança conformacional, permitindo sua associação com a subunidade PP1c da MLCP, formando um complexo inativo entre PP1c da MLCP e CPI-17 fosforilada, corroborando para o passo anterior no aumento da sensibilidade ao cálcio (ETO, 2009).

Como citado inicialmente, o aumento de cálcio citosólico é o gatilho necessário para a contração muscular, sendo assim, moléculas bioativas capazes de inibir qualquer passo da via contrátil, tornam-se potencialmente promissoras para o tratamento de doenças que afetem o músculo liso vascular.

Para que ocorra o processo de relaxamento no músculo liso, de forma oposta ao que ocorre no processo de contração, deve haver uma diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, de modo que esta redução pode ocorrer por inibição do acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico. O acoplamento eletromecânico envolve as alterações de potencial de membrana opostas às observadas no processo contrátil, induzindo então repolarização ou hiperpolarização da membrana. Este fato pode ocorrer pelo bloqueio dos Ca_v da membrana plasmática ou pela ativação de canais de K^+ (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

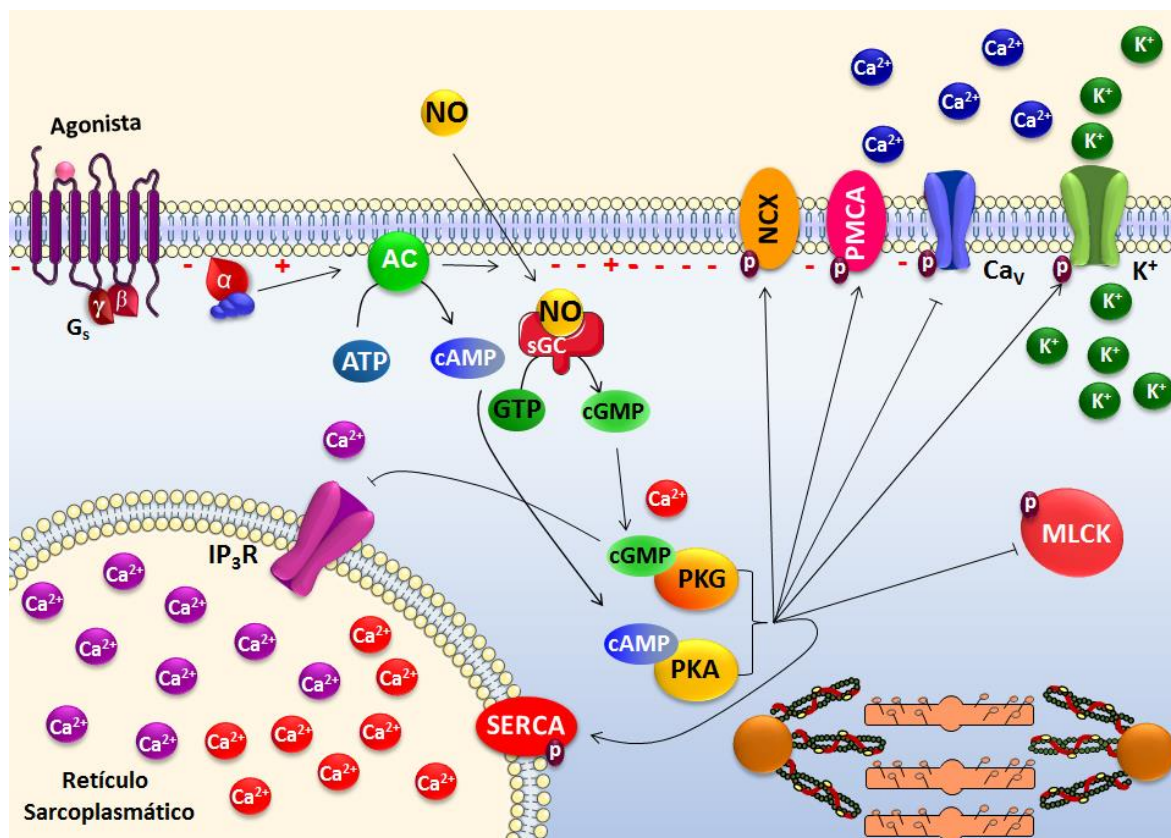
Já no mecanismo farmacomecânico, alguns agonistas induzem relaxamento por meio da ligação aos seus receptores que ativam diretamente uma ciclase de guanilil (GC), como o óxido nítrico (NO), ou de adenilil (AC), como a prostaciclina (PGI_2), resultando na formação do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) e monofosfatocíclico de adenosina (cAMP), respectivamente, que através da

ativação ou inibição de diversos alvos, levará à diminuição do cálcio citosólico (REMBOLD, 1996).

O aumento de nucleotídeos cíclicos nas células da musculatura lisa vascular irá causar a ativação das proteínas cinases A e G (PKA e PKG), respectivamente (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009). Estas proteínas cinases aumentam a atividade de Ca^{2+} -ATPases, tanto do RS (SERCA), quanto da membrana plasmática (PMCA), aumentando o sequestro e a extrusão de Ca^{2+} , respectivamente. As proteínas cinases ativam o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX); promovem a inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo Ca^{2+} -CaM, ocasionando uma redução nos níveis de MLC fosforilada; inibem não só de forma direta os Ca_v , como também indiretamente, por ativação dos canais de K^+ que, por uma hiperpolarização, bloqueiam os Ca_v ; a PKG também fosforila e inativa o IP_3R , reduzindo sua capacidade de liberar o Ca^{2+} do RS. Todos esses eventos levam ao relaxamento do músculo liso (Figura 7) (WOODRUM; BROPHY, 2001; DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004).

Diante do exposto, baseado no fato de que amidas naturais e sintéticas já apresentaram atividade vasorrelaxante, e que a amida MFTA já apresentou atividade relaxante em aorta de rato, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o seu mecanismo de ação vasorrelaxante, por fim, avaliar através de estudos *in silico* a sua afinidade de ligação a alvos específicos, toxicidade e biodisponibilidade oral. Dessa forma, podendo gerar subsídios científicos na busca de novas amidas sintéticas com uso terapêutico, ou mesmo servir como ferramenta farmacológica para outros ensaios.

Figura 7 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso vascular induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) a proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α (processo não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade $G_{\alpha s}$ -GTP ativa a AC; (4) a AC converte o ATP em cAMP; (5) o NO gerado nas células endoteliais estimula a atividade da sGC; (6) a sGC converte o GTP em cGMP; (7) os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) ativam os canais de K^+ ; (9) inibem os Ca_v ; (10) aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) ativam o NCX; (12) A PKG inibe os IP_3R . Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_c$; (13) inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM. Todos esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, consequentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: FERREIRA, 2022.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o mecanismo de ação vaso relaxante da MFTA em aorta de rato, utilizando abordagens *in vitro* e *in silico*, contribuindo para o estudo farmacológico de amidas sintéticas, com a finalidade de colaborar na descoberta de fármacos com potencial terapêutico para desordens vasculares, ou que possam ser utilizadas como ferramentas farmacológicas na investigação dos mecanismos de contração e relaxamento.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar e comparar os parâmetros de eficácia e potência relativas do efeito relaxante da MFTA em aorta torácica de ratos, na presença e na ausência de endotélio funcional;
- Investigar a participação dos canais de potássio ou de cálcio dependentes de voltagem no efeito vasorrelaxante induzido pela MFTA em aorta de rato;
- Avaliar a participação da via da Rho cinase no efeito vasorrelaxante induzido pela MFTA em aorta de rato;
- Realizar estudos *in silico* avaliando possíveis alvos moleculares de ação para a MFTA;
- Predizer a toxicidade *in silico* da MFTA e as características farmacocinéticas para a MFTA.

4 Material e métodos

4.1 Material

4.1.2 Produto-teste

Para a realização desta pesquisa foi utilizada a amida tiofênica sintética (*E*)-*N*-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA) que foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.1.3 Animais

Eram utilizados ratos Wistar (250-300 g) da espécie *Rattus norvegicus* com 60 dias de idade, adquiridos na Unidade de Produção de Animais (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM)/UFPB. Os animais eram mantidos sob controle de temperatura (22 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à ração e à água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 8073300419 (Anexo 1). Os experimentos eram realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB.

4.1.4 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o cloreto de potássio (KCl), o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4), o cloreto de sódio (NaCl), o ácido clorídrico (HCl), o hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Êxodo Científica (Brasil).

O cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN), o cloridrato de acetilcolina (ACh), e o Cremophor® foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). O ácido (4*S*)-1,4-di-hidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-piridinacarboxílico (S(-)-Bay K8644) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (Brasil). O trans-4-[(1*R*)-1-aminoetil]-*N*-4-piridinil-ciclohexanocarboxamida (Y-27632) foi obtido da Cayman Chemical

Company. A mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) foi obtida da White Martins (Brasil).

Todas as substâncias eram mantidas em um “freezer” à temperatura de 4-8 °C, dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o S-(-)-Bay K8644 e o Y-27632 que eram dissolvidos em álcool absoluto (96 °GL) para obtenção de cada solução-estoque, sendo este último mantido ao abrigo da luz.

4.1.5 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados, eram utilizadas várias soluções nutritivas (ajustadas ao pH 7,4, com uma solução de HCl ou NaOH (1N), gaseificadas com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e a 37 °C, cujas composições estão descritas abaixo:

4.1.5.1 Solução de Krebs normal (mM): NaCl (118,0), KCl (4,5), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), CaCl₂ (2,5), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

4.1.5.2 Solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl (mM): NaCl (92,5), KCl (30,0), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), CaCl₂ (2,5), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

4.1.5.3 Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl (mM): NaCl (42,5), KCl (80,0), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), CaCl₂ (2,5), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

4.1.5.4 Solução de Krebs despolarizante nominalmente sem cálcio (mM): NaCl (42,5), KCl (80,0), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

4.1.6 Preparação das soluções-estoque da MFTA para os ensaios farmacológicos

A MFTA era solubilizada em Cremophor® e diluída em água destilada para obtenção da solução-estoque (10⁻² M, 3% Cremophor® v/v) que era estocada a uma temperatura de 0 °C. A concentração final de Cremophor® na cuba nunca excedeu 0,01%. Nesta concentração o Cremophor® é desprovido de efeito contrátil ou

relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

4.1.7 Aparelhos

Para registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) modelo BOI-04 e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, era conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e ANCAD para análise. O sistema contém uma bomba termostática modelo BT-60 que controla a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo-SP, Brasil).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semianalítica modelo BG4001, ambas da Gehaka (Brasil). Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta de rato com e sem endotélio funcional

Os ratos eram eutanasiados por anestesia com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), seguido por um método complementar de exsanguinação. A aorta torácica era retirada e limpa de todo o tecido conectivo e adiposo, em seguida dividida em anéis de 3-5 mm, e os mesmos eram suspensos em uma alça de aço inoxidável em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) contendo solução de Krebs a 37 °C.

Para a estabilização, os anéis aórticos eram mantidos por um período de 60 minutos, sob tensão de 1 g e gaseificados com carbogênio. Durante esse tempo, a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos, bem como, renovação de nutrientes como a glicose (ALTURA;

ALTURA, 1970). Após esse período eram induzidas contrações com 3×10^{-7} M de FEN e durante o componente tônico dessa contração foi adicionado 10^{-6} M de ACh para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980).

O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentaram relaxamento induzido por acetilcolina igual ou superior a 50%. Em relaxamento inferior a 10%, os anéis eram considerados sem endotélio funcional (AJAY; GILANI; MUSTAFA, 2003). Após a lavagem, esperava-se 30 minutos, e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, a MFTA era adicionada de maneira cumulativa à cuba.

O relaxamento da MFTA foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por FEN, os valores de CE_{50} (concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo) foram calculados por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para a amida em anéis com e sem endotélio funcional. Foram utilizados os valores do E_{max} (efeito máximo) como parâmetro de eficácia.

4.2.2 Avaliação da participação dos canais de potássio ou de cálcio dependente de voltagem no mecanismo vasorrelaxante da MFTA em aorta de rato

4.2.2.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou por 80 mM de KCl

A aorta era montada como descrito anteriormente, de forma que os anéis eram usados na presença do endotélio funcional. Após o período de estabilização em solução de Krebs normal, esta era trocada por solução contendo 30 ou 80 mM de KCl, induzindo uma contração (GURNEY, 1994) e sobre o componente tônico desta contração a amida era adicionada de maneira cumulativa.

O relaxamento da MFTA foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl, e os valores de E_{max} da amida foram obtidos para contrações induzidas por solução de 30 e 80 mM de KCl. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para MFTA com a solução de 30 ou 80 mM de KCl.

4.2.2.2 Efeito da MFTA frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

A aorta era montada como descrito anteriormente. Após o período de estabilização em solução de Krebs normal, esta era substituída pela solução despolarizante (KCl 80 mM) nominalmente sem Ca^{2+} durante um período de 45 minutos. Durante esse tempo, a preparação era lavada a cada 15 minutos. Eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 e em seguida, a MFTA era incubada em concentrações diferentes, na ausência de CaCl_2 , por 15 minutos e, após esse período, uma terceira curva concentrações-resposta cumulativa ao CaCl_2 era obtida na presença da amida (VAN ROSSUM, 1963).

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil ao CaCl_2 na presença da MFTA com a obtida pela amplitude média das curvas controle na ausência da amida. O efeito inibitório da amida foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e do E_{max} do CaCl_2 calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença da amida.

4.2.2.3 Efeito da MFTA sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644

A aorta era montada como descrito anteriormente. Após o período de estabilização em solução de Krebs normal, previamente era induzida uma contração com 10 mM de KCl, e após o período de 10 minutos, era adicionado 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (AUGUET et al., 1988), um agonista seletivo dos Ca_v do tipo L ou Ca_v1 (FERRANTE et al., 1989). Esta substância era guardada ao abrigo da luz, e as cubas de banho eram revestidas com papel alumínio. Sobre o componente tônico dessa contração, a MFTA era adicionada de maneira cumulativa à cuba. Os valores de E_{max} e de CE_{50} da amida foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a eficácia e a potência vasorrelaxante da MFTA foram comparadas na ausência e na presença do agonista.

4.2.3 Avaliação da participação da RhoA/Rho cinase no mecanismo vasorrelaxante da MFTA em aorta de rato

4.2.3.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de Y-27632

A aorta era montada como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 3×10^{-7} de FEN para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma nova contração era induzida por 3×10^{-7} de FEN e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado a MFTA de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado à cuba 10^{-6} M de Y-27632, um inibidor não seletivo da ROCK (SAKAMOTO et al., 2003), e após 30 minutos, uma contração era induzida com 3×10^{-7} de FEN e sobre o componente tônico era adicionada a amida de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pela MFTA foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por FEN. Os valores de E_{\max} e de CE_{50} da amida foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a eficácia e a potência vasorrelaxante da MFTA foram comparadas na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.4 Estudos *in silico* com a MFTA

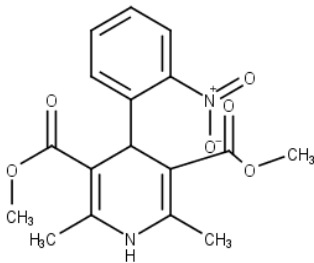
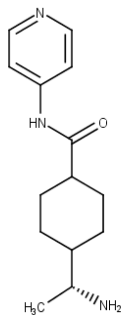
4.2.4.1 *Docking* molecular da MFTA

O *docking* molecular foi utilizado para investigar o mecanismo de ação da MFTA *in silico*, a fim de contribuir no estudo da atividade vasorrelaxante desta substância, confirmando possíveis alvos de ação, através da avaliação da afinidade de ligação entre a amida e duas proteínas envolvidas no mecanismo vasorrelaxante *in vitro*, os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) e a Rho cinase.

As estruturas 3D dessas proteínas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org>) (BERNSTEIN et al., 1977; RCSB Protein Data Bank). As proteínas selecionadas e informações detalhadas sobre elas podem ser visualizados na Tabela 1.

Inicialmente, ocorreu a preparação dos ligantes utilizados. O nifedipino (bloqueador de Cav), o Y-27632 (inibidor de Rho cinase) e a MFTA (substância-teste), foram desenhados no programa *ChemBioDraw Ultra* (ChemDraw). Em seguida as estruturas químicas eram minimizadas por métodos de mecânica molecular, pelo programa *Spartan* (Wavefunction Spartan). Todas as moléculas de água eram removidas da estrutura cristalina, em seguida era criado um “*template*” entre a proteína e o ligante co-cristalizado, com a finalidade de demarcar o sítio ativo, prosseguido com a inserção da molécula-teste, e por fim realizada a simulação de *docking* molecular.

Tabela 1 - Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo.

Proteína	PDB ID	Controle Positivo	Resolução
Canal de cálcio dependente de voltagem	3G43	 <p>Nifedipino</p>	2.10 Å
Rho cinase	2ETR	 <p>Y-27632</p>	2.60 Å

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

4.2.4.2 Cálculo de acoplamento molecular e visualização das interações

Para a realização das simulações de *docking* molecular foi utilizado o software Molegro Virtual Docker (MVD) (CLC Bio Company. Mollegro Virtual Docker) e o ligante complexado foi usado para definir o sítio ativo. Em seguida, os compostos foram importados, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético dos algoritmos MolDock score e Rerank score (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; AZEVEDO; WALTER, 2010; PRAKOESWA; PURWANTO; ENDARYANTO, 2020).

O algoritmo Moldock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: um total de 10 execuções com um máximo de 1500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2000 etapas de minimização global por corre. A função de pontuação MolDock score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp²-sp².

Para a realização da visualização das interações e obtenção das figuras de acoplamento molecular foi utilizado o *software* Discovery Studio Visualizer (Biovia. Accelrys Discovery Studio).

4.2.5 Análise teórica *in silico* de toxicidade e biodisponibilidade para a MFTA

Para a predição dos riscos de toxicidade foi usado o programa OSIRIS DataWarrior 5.0 no qual foram analisados os possíveis riscos da MFTA, com base na similaridade com estruturas comprovadamente capazes de causar mutagenicidade, tumorigenicidade e/ou irritabilidade tecidual.

Na avaliação da biodisponibilidade, dois parâmetros foram avaliados, a taxa de absorção por via oral e a regra de Lipinski. No primeiro foi calculada a área de superfície polar total (TPSA), utilizando-se da seguinte equação, “% absorção = 109 - (0.345 x TPSA)” (CHOUDHARY et al., 2018). Na “regra dos cinco” de Lipinski, foram avaliados quatro parâmetros que influenciam a

biodisponibilidade de um candidato a fármaco: 1) composto não pode apresentar peso molecular (PM) menor que 500 Da; 2) coeficiente de partição (logP) menor ou igual a 5; 3) número de aceptores de ligações de hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; e 4) número de doadores de ligações de hidrogênio (nDLH) até 5. Comumente um fármaco só pode violar até um único parâmetro para que sua biodisponibilidade não seja comprometida (LIPINSKI et al., 1997; LIPINSKI et al., 2019). Resumidamente avaliação da biodisponibilidade segue dois parâmetros:

1. Taxa de absorção por via oral (TPSA).
2. Regra de lipinski: PM, logP, nALH, nDLH.

4.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como a percentagem da média e o erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (dois grupos) ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Tukey (múltiplos grupos). A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Os valores de CE_{50} foram calculados por regressão não linear. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (NEUBIG, 2003).

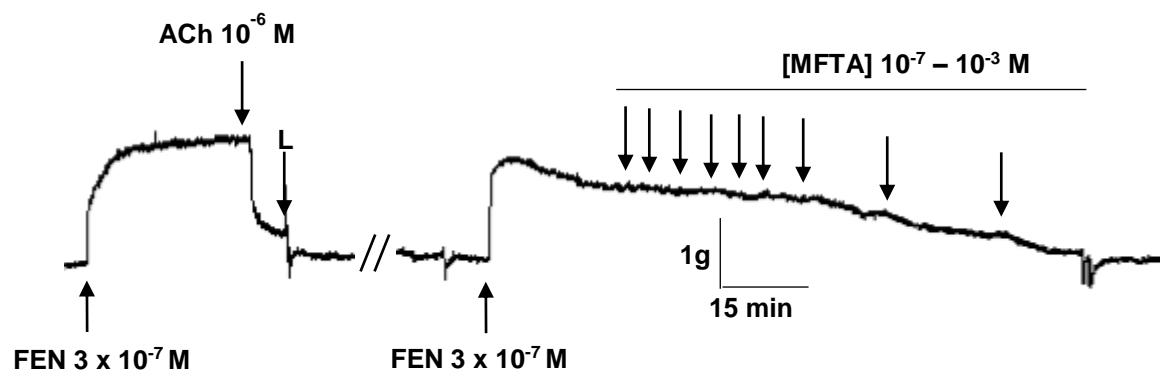
5 Resultados

5.1. Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta de rato com e sem endotélio funcional

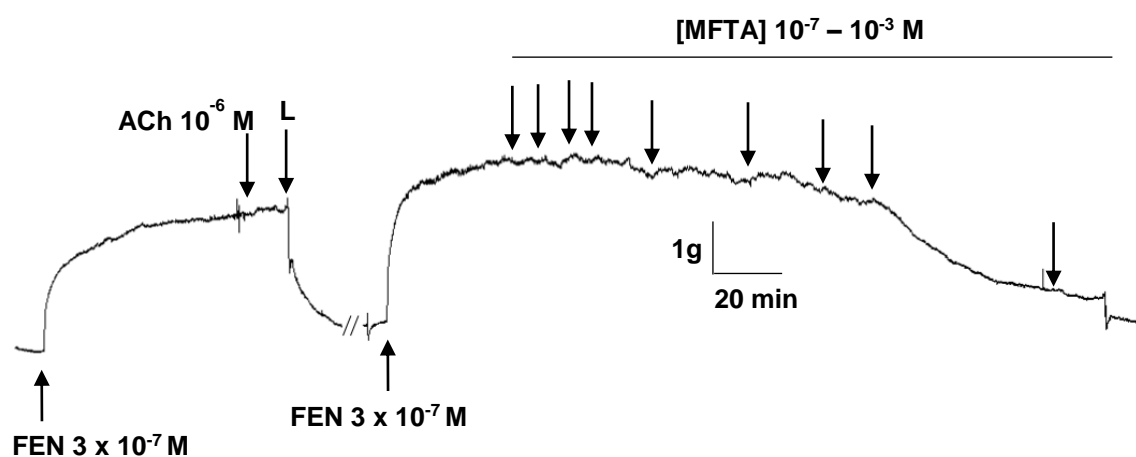
A amida ($10^{-7} - 10^{-3}$ M, $n = 5$) relaxou de maneira dependente de concentração e equipotente a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, tanto na presença ($E_{\max} = 100\%$ e $CE_{50} = 1,1 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M) quanto na ausência ($E_{\max} = 100\%$ e $CE_{50} = 1,3 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ M) de endotélio funcional (Figura 8 e Gráfico 1).

Figura 8 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da MFTA em anéis de aorta de rato pré-contráida com 3×10^{-7} M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.

A



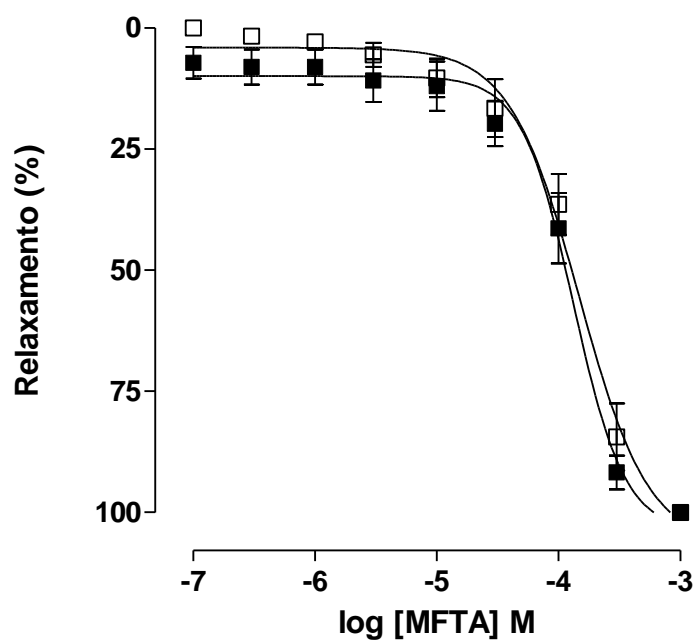
B



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas da MFTA adicionadas às cubas.

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

Gráfico 1 – Efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na presença (■) e na ausência (□) de endotélio funcional em anéis de aorta de rato.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

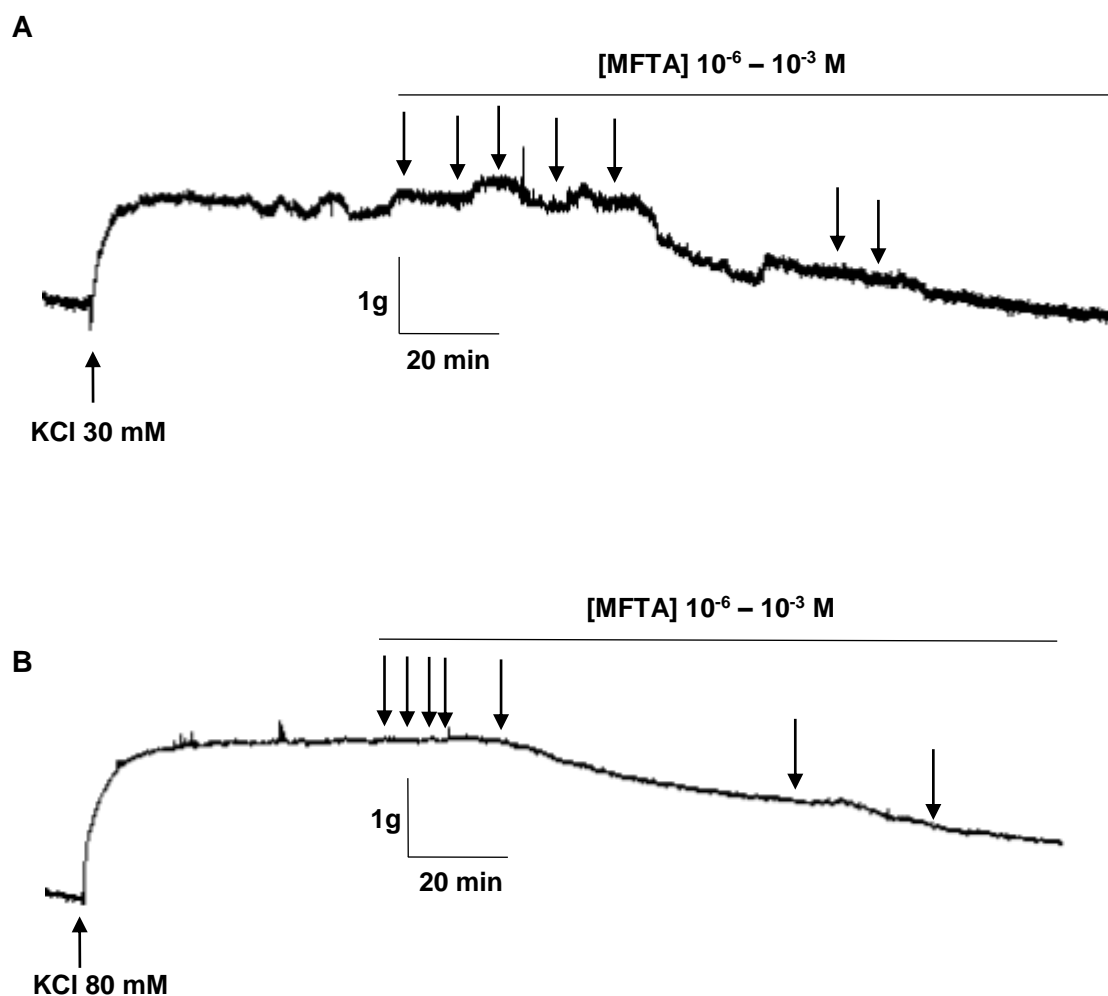
Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

5.2 Avaliação da participação dos canais de potássio ou de cálcio dependente de voltagem no mecanismo vasorrelaxante da MFTA em aorta de rato

5.2.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou por 80 mM de KCl

A amida (10^{-6} – 10^{-3} M, $n = 5$) relaxou de maneira dependente de concentração a aorta de rato pré-contraída tanto com moderada concentração (30 mM) ($E_{\max} = 95,4 \pm 4,6\%$ e $CE_{50} = 1,9 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M) quanto com elevada concentração (80 mM) de KCl ($E_{\max} = 98,7 \pm 1,3\%$ e $CE_{50} = 8,3 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M), apresentando assim uma potência relaxante de aproximadamente duas vezes maior quando esses anéis eram pré-contraídos com elevadas concentrações de KCl (Figura 9 e Gráfico 2).

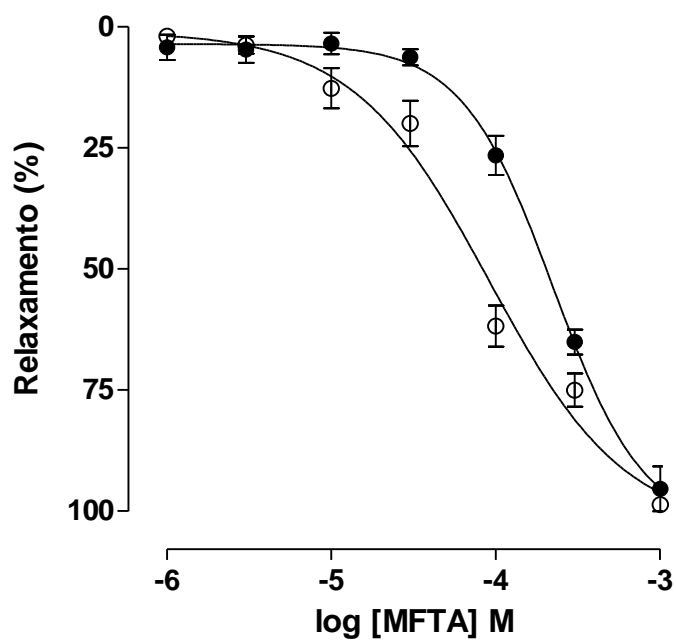
Figura 9 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (A) e por 80 mM (B) de KCl em anéis de aorta de rato.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas de MFTA adicionadas às cubas.

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

Gráfico 2 – Efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (●) e por 80 mM (○) de KCl em anéis de aorta de rato.



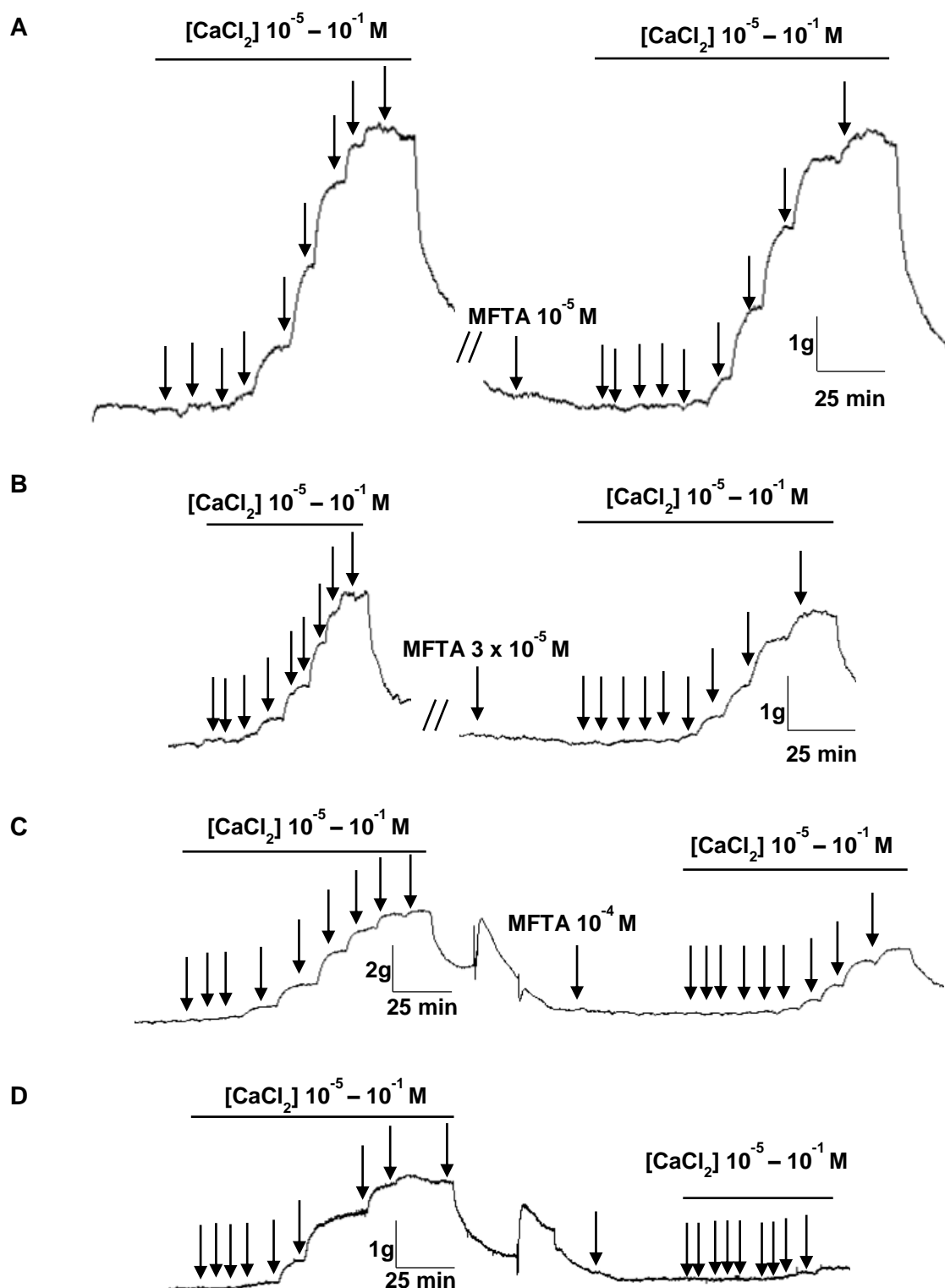
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

5.2.2 Efeito da MFTA frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

A MFTA (10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} e 3×10^{-4} M, $n = 5$) inibiu de maneira dependente de concentração as contrações cumulativas induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio, com desvio da curva controle para direita e redução do E_{max} de 100% (controle) para $95,6 \pm 4,5$; $68,4 \pm 5,2$; $54,0 \pm 3,4$ e $19,4 \pm 3,5\%$, respectivamente. Os valores de CE_{50} do CaCl_2 passaram de $2,0 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M (controle) para $1,5 \pm 0,2 \times 10^{-3}$; $2,8 \pm 0,2 \times 10^{-3}$; $7,0 \pm 1,2 \times 10^{-3}$ e $1,2 \pm 0,5 \times 10^{-2}$ M, respectivamente (Figura 10 e Gráfico 3).

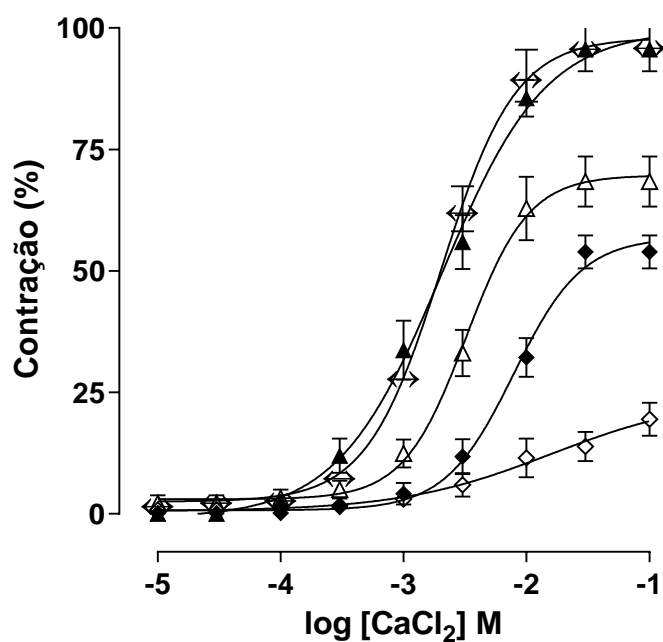
Figura 10 – Registros originais representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 na presença da MFTA nas concentrações de 10^{-5} (A); 3×10^{-5} (B); 10^{-4} (C) e 3×10^{-4} M (D) em anéis de aorta de rato



As setas para baixo representam a adição cumulativa do CaCl_2 (A, B, C e D).

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

Gráfico 3 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (\leftrightarrow) e na presença da MFTA nas concentrações 10^{-5} (\blacktriangle), 3×10^{-5} (\triangle), 10^{-4} (\blacklozenge) e 3×10^{-4} (\diamond) M em anéis de aorta de rato.



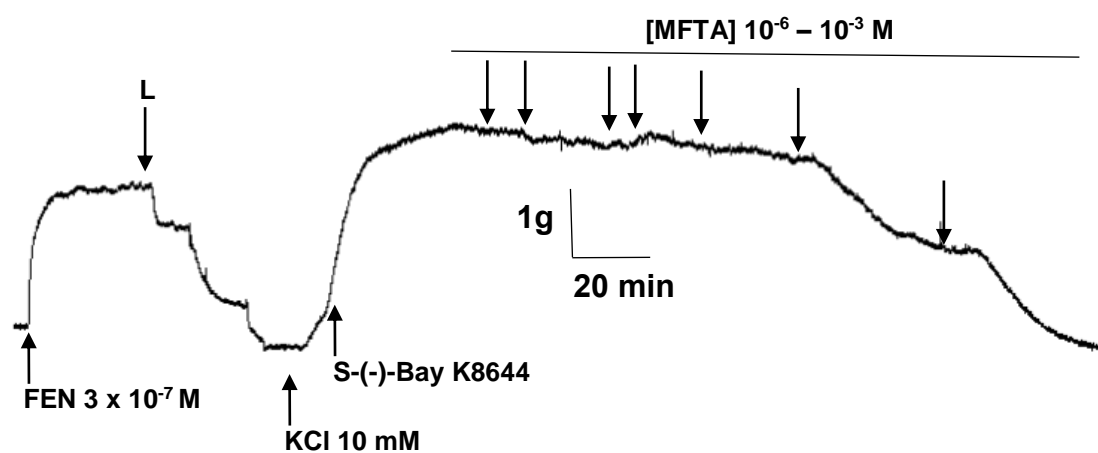
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

5.2.3 Efeito da MFTA sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644

A MFTA (10^{-6} – 10^{-3} M, $n = 5$) relaxou de maneira dependente de concentração a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 ($E_{\max} = 100\%$ e $CE_{50} = 6,3 \pm 1,6 \times 10^{-5}$ M). O relaxamento foi equipotente quando comparado a curva de relaxamento da amida na presença de altas concentrações (80 mM) de KCl ($E_{\max} = 98,7 \pm 1,3\%$ e $CE_{50} = 8,3 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M) (Figura 11 e Gráfico 4).

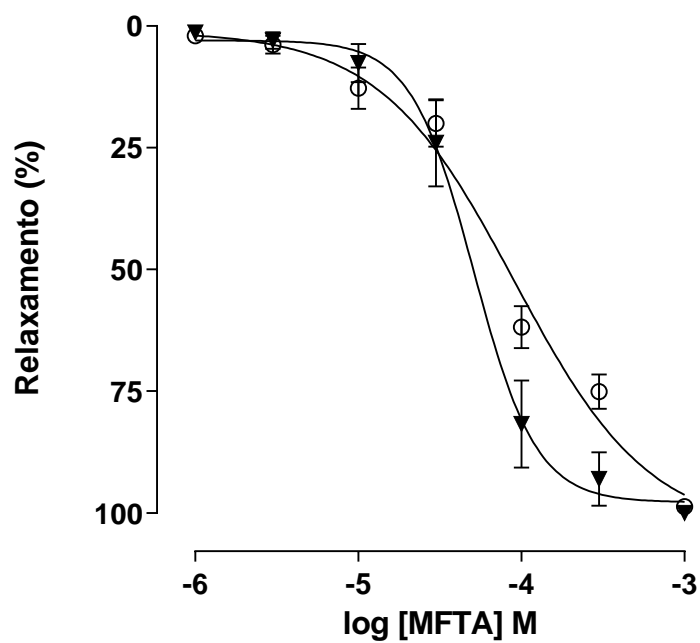
Figura 11 – Registro original representativo do efeito vasorrelaxante da MFTA em anéis de aorta de rato pré-contráídos com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644.



As setas para baixo representam a adição cumulativa de MFTA.

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

Gráfico 4 – Efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M S-(-)-Bay K8644 (▼) ou por 80 mM de KCl (○) em anéis de aorta de rato.



Os símbolos apresentam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

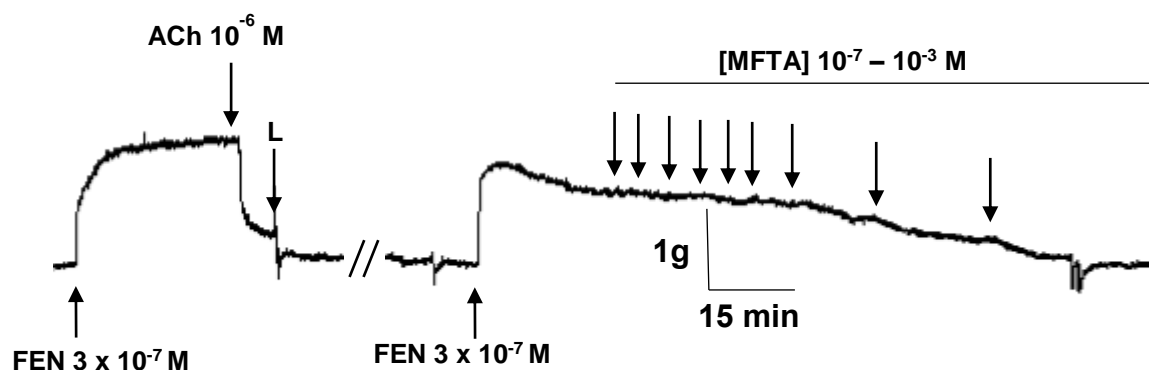
5.3 Avaliação da participação da RhoA/Rho cinase no mecanismo vasorrelaxante da MFTA

5.3.1 Efeito da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença Y-27632

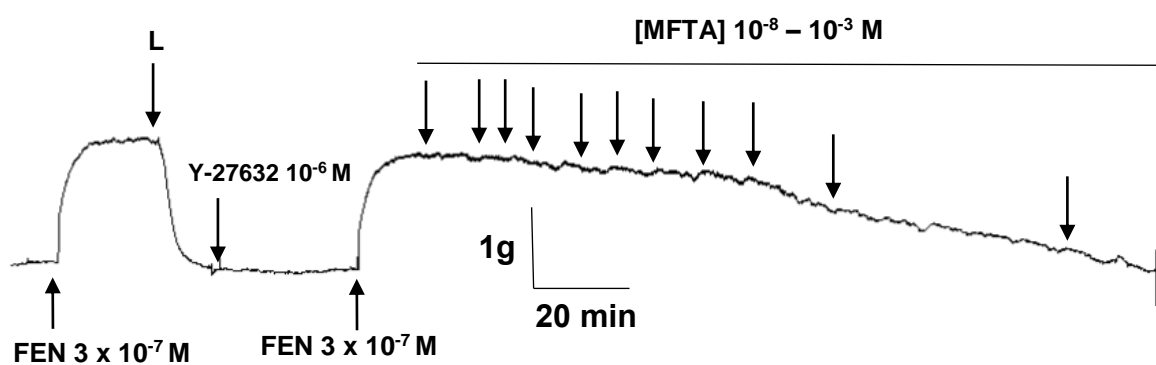
A curva controle de relaxamento da MFTA ($E_{\max} = 100\%$ e $CE_{50} = 1,1 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $n = 5$) não foi alterada na presença de 10^{-6} M de Y-27632 ($E_{\max} = 100\%$ e $CE_{50} = 5,4 \pm 1,1 \times 10^{-5} \text{ M}$, $n = 3$), sem alteração da eficácia e da potência relaxante (Figura 12 e Gráfico 5).

Figura 12 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 10^{-6} M de Y-27632 (**B**) em anéis de aorta de rato.

A



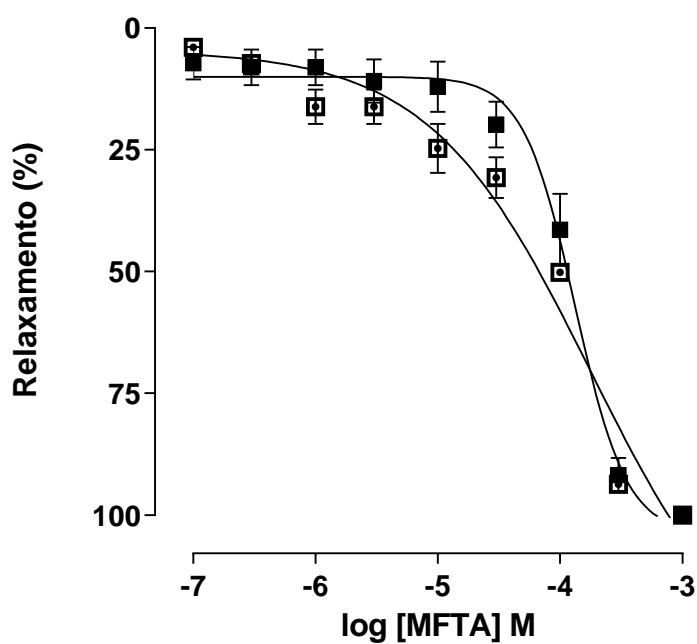
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa de MFTA.

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

Gráfico 5 – Efeito vasorrelaxante da MFTA sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença de 10^{-6} M de Y-27632 (▣) em anéis de aorta de rato.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 3-5).

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

5.4 Estudos *in silico* com a MFTA

5.4.1 *Docking* molecular da MFTA

A MFTA foi submetida ao rastreio por meio de *docking* molecular em duas proteínas, o Cav1 e a ROCK. Os resultados de *docking* foram gerados usando como função de pontuação o Moldock score e Rerank score. A afinidade da MFTA aos alvos estudados foi confirmada quando a amida obteve menor ou igual valor de energia de ligação ao controle positivo nas funções de pontuação. Os resultados de *docking* podem ser visualizados na tabela 2, de modo que os melhores resultados estão destacados em negrito.

Tabela 2 – Valores de energia de ligação da MFTA analisados nas duas proteínas selecionadas no estudo.

Alvo	Moldock score (kcal/mol)		Rerank score (kcal/mol)	
	MFTA	CP	MFTA	CP
Ca _v	-132,993	-81,7718 (nifedipino)	-111,595	122,982 (nifedipino)
ROCK	-78,5828	-76,8306 (Y-27632)	-60,6458	-73,3509 (Y-27632)

Ca_v = canal de cálcio dependente de voltagem; ROCK = proteína cinase associada à Rho; CP = controle positivo.

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

No algoritmo Moldock score, tanto para o Ca_v (**-132,993 kcal/mol**) como para a ROCK (**-78,5828 kcal/mol**), a MFTA obteve energias mais negativas que os controles positivos nifedipino (-81,7718 kcal/mol) e Y-27632 (-76,8306 kcal/mol) respectivamente. Na análise do algoritmo Rerank score, apenas para o Ca_v (**-111,595 kcal/mol**) a MFTA apresentou energia mais negativa que o controle positivo nifedipino (122,982 kcal/mol), de modo que para ROCK, a amida apresentou valor de energia menos negativo (-60,6458 kcal/mol) quando comparado ao controle positivo Y-27632 (**-73,3509 kcal/mol**).

5.4.1.1 Avaliação da interação molecular entre a MFTA, o nifedipino e o Ca_v

A entalpia de formação do complexo ligante-macromolécula entre a MFTA e o Cav foi de -132,993 kcal/mol para o Moldock score e -111.595 kcal/mol para o Rerank score, valores mais negativos que as entalpias observadas entre o controle positivo nifedipino, -81,7718 kcal/mol e 122,982 kcal/mol respectivamente (Tabela 2).

Além disso, observou-se que as interações da MFTA com o Cav são do tipo estéricas (linhas pontilhadas laranjas), que se formam entre átomos apolares, e foram estabelecidas com os átomos de carbono (C) do anel tiofeno por meio do resíduo Arg⁶⁶⁴. Outra interação observada correspondeu às interações do tipo ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas em verde) entre os átomos de oxigênio (O) do grupamento hidroxila através do resíduo Gln⁴⁹⁶ e do grupamento carbonila pelos aminoácidos Ile⁵⁸¹ e Cys⁹⁷⁵. Ainda foram observadas interações de hidrogênio com os átomos de hidrogênio (H) da cadeia carbônica por meio do resíduo Cys⁹⁷⁵ e com os átomos de hidrogênio do anel tiofeno através dos aminoácidos Gly⁹⁴³, Thr⁹³⁹ e Leu⁵⁸⁰ (Figura 13).

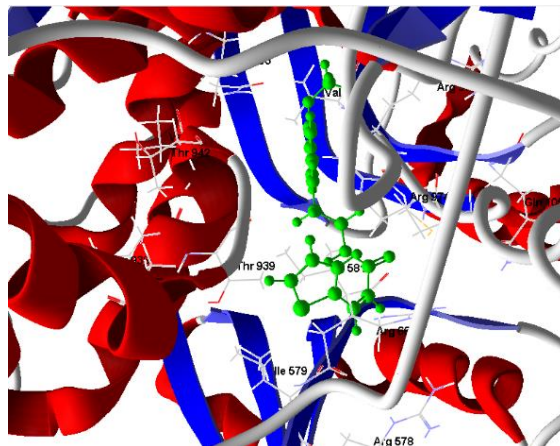
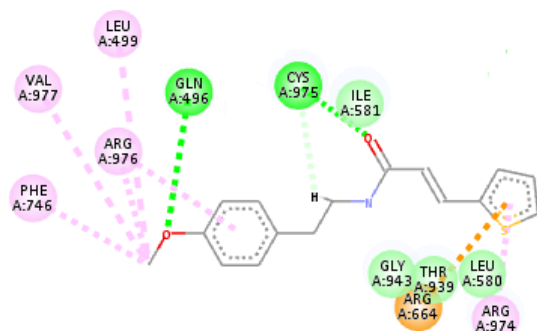
Além disso, foram observadas interações hidrofóbicas (linhas pontilhadas em rosa) com o átomo de enxofre do anel tiofeno por meio do resíduo Arg⁹⁷⁴, com os átomos de carbono do anel benzeno através do aminoácido Arg⁹⁷⁶ e de uma forma mais prevalente com os átomos de carbono do grupamento metoxila por meio dos resíduos Arg⁹⁷⁶, Leu⁴⁹⁹, Val⁹⁷⁷ e Phe⁷⁴⁶ (Figura 13).

Já as interações observadas para o nifedipino foram do tipo interações estéricas (linhas pontilhadas em vermelho), sendo estabelecidas com os átomos de hidrogênio do anel aromático por meio do resíduo Arg³⁶⁸ e com os átomos de hidrogênio do grupamento metila através do resíduo Tyr⁵³⁷. Ocorreram ainda interações do tipo hidrogênio (linha pontilhada em verde) com os átomos de hidrogênio dos grupamentos hidroxila por meio dos resíduos Ala⁹²⁶, Ser⁵¹² e Asn⁵⁰⁹, com os átomos de oxigênio do grupamento carbonila através dos resíduos Phe⁵¹¹, Glu⁵³⁵ e com o átomo de oxigênio do grupamento hidroxila por meio do resíduo Met⁵¹³. Além disso, foram observadas interações hidrofóbicas (linhas pontilhadas em rosa) com os átomos do anel aromático por meio dos resíduos Ala⁹²⁶ e Met⁵¹³ e com o grupamento metila por meio do resíduo Tyr⁵³⁷.

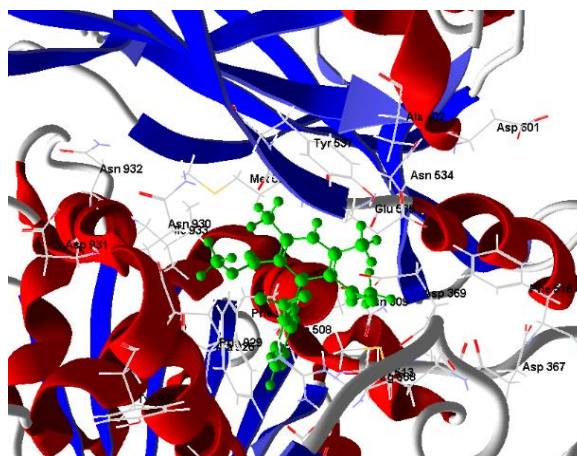
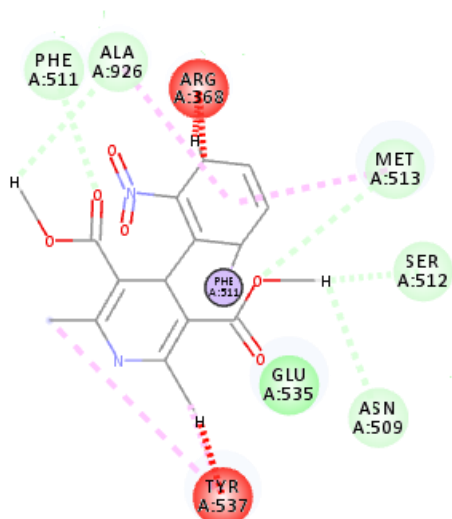
Não foram observadas interações semelhantes estabelecidas entre a amida e o nifedipino com o alvo. O acoplamento molecular entre a MFTA, o nifedipino e o canal de cálcio dependente de voltagem estão demonstrados na Figura 13.

Figura 13 - Interações 2D e 3D entre o composto (*E*)-*N*-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA) (**A**), o nifedipino (**B**) e o canal de cálcio dependente de voltagem.

A



B



Interações hidrofóbicas estão destacadas em rosa, as de hidrogênio em verde e as estéricas em laranja e em vermelho. Resíduos: Leu (leucina), Gln (glutamina), Cys (cisteína), Ile (isoleucina), Arg (arginina), Val (valina), Phe (fenilalanina), Gly (glicina), Thr (treonina), Ala (alanina), Met (metionina), Ser (serina), Glu (ácido glutâmico), Asn (asparagina) e Tyr (tirosina).

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

5.4.1.2 Avaliação da interação molecular entre a MFTA, o Y-27632 e a ROCK

A entalpia de formação do complexo ligante-macromolécula entre a MFTA e a ROCK foi de -78,5828 kcal/mol para o Moldock score, valor pouco mais negativo que a entalpia observada entre o controle positivo Y-27632 (-76,8306 kcal/mol).

Em contrapartida a entalpia de formação do ligante-macromolécula entre a MFTA e a ROCK quando avaliada a função de pontuação Rerank score foi de -60,6458 kcal/mol, valor menos negativo que a entalpia observada para o controle positivo Y-27632 (-73,3509 kcal/mol)

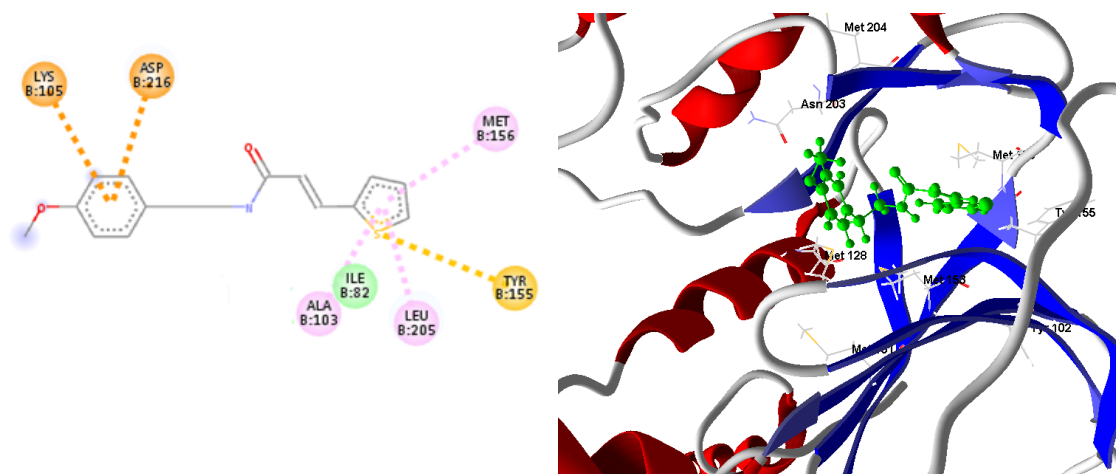
Além disso, foi observado que as interações da MFTA com a enzima ROCK são do tipo estéricas (linhas pontilhadas laranjas), que se formam entre átomos apolares, tendo sido estabelecidas com átomos do anel aromático por meio dos resíduos de Lys¹⁰⁵ e Asp²¹⁶, como também pelo resíduo Tyr¹⁵⁵ com o átomo de enxofre (S) do anel tiofeno. O anel tiofeno também foi responsável pelo estabelecimento de interações do tipo hidrofóbicas (linha pontilhada em rosa) por meio dos resíduos Ala¹⁰³, Met¹⁵⁶ e Leu²⁰⁵, também sendo observada nesse grupo a interação do tipo ligação de hidrogênio (linha pontilhada em verde), a qual ocorre com grupamentos polares, tendo sido estabelecida pelo aminoácido Ile⁸² (Figura 14).

Foi observado também que o controle positivo (Y-27632) estabeleceu apenas interações do tipo ligação de hidrogênio (linha pontilhada em verde) e interações hidrofóbicas (linhas pontilhadas em rosa). As interações de hidrogênio compreenderam dois grupamentos principais. O primeiro corresponde aos átomos de hidrogênio dos anéis aromáticos por meio dos resíduos Glu¹⁵⁴ e Val⁹⁰, o segundo grupo corresponde aos átomos de nitrogênio (N) dos grupamentos amina (NH) por meio dos aminoácidos Met¹⁵⁶, Tyr¹⁵⁵, Asn²⁰³ e Asp²¹⁶. Com relação as interações hidrofóbicas, estas foram estabelecidas com os átomos dos anéis aromáticos por meio dos resíduos Ala¹⁰³, Leu²⁰⁵ e Ala²¹⁵ (Figura 14).

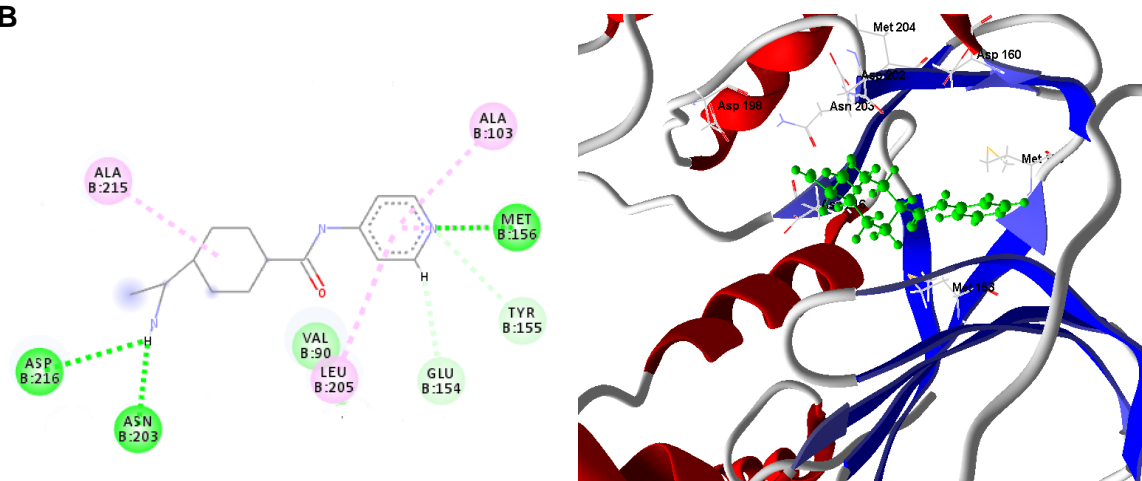
Por fim, ocorreram interações semelhantes entre a MFTA e o inibidor Y-27632, sendo estas correspondentes as interações hidrofóbicas estabelecidas pelos resíduos Leu²⁰⁵ e Ala¹⁰³. O acoplamento molecular entre a MFTA, o Y-27632 e a Rho cinase está demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – Interações 2D e 3D entre o composto (*E*)-*N*-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida (MFTA) (**A**), o Y-27632 (**B**) e a macromolécula ROCK-1.

A



B



Interações hidrofóbicas estão destacadas em rosa, as de hidrogênio em verde e as estéricas em laranja. Resíduos: Lys (lisina), Asp (ácido aspártico), Met (metionina), Tyr (tirosina), Leu (leucina), Ile (isoleucina), Ala (alanina), Glu (ácido glutâmico), Val (valina) e Asn (asparagina).

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

5.4.2 Análise teórica *in silico* de toxicidade e biodisponibilidade

Avaliou-se a toxicidade da MFTA (Tabela 3) a partir da mutagenicidade, capacidade que a substância tem de provocar mutações no DNA; tumorigenicidade, capacidade do composto em provocar o surgimento de tumores; e irritabilidade da pele, que corresponde a sensibilidade que o composto pode provocar na pele e em tecidos de órgãos internos como esôfago, laringe, estômago e intestino, de modo que a MFTA não apresentou toxicidade na avaliação *in silico* dos três parâmetros.

Tabela 3 – Análise teórica *in silico* de toxicidade da MFTA.

Toxicidade			
composto	mutagenicidade	tumorigenicidade	irritabilidade
MFTA	não	não	não

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

Paralelamente foram calculadas as propriedades farmacocinéticas da amida através da análise da absorção e das violações da regra de Lipinski (Tabela 4), as propriedades físico-químicas da MFTA foram calculadas de acordo com o peso molecular de 287,382 g/mol, apresentando assim uma considerável área de superfície polar total (TPSA) de 66,57 Å, uma alta taxa absorção em cerca 86,03%, e um baixo coeficiente de partição (logP) de 3,0724. Além disso, a MFTA apresentou baixos números de aceptores (3) e doadores (1) de ligação hidrogênio.

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas, calculadas *in silico*, para a MFTA.

biodisponibilidade							
absorção			regra de Lipinski				
composto	TPSA (Å)	% absorção	PM (g/Mol)	aceptores de H	doadores de H	Log P	violações
MFTA	66,57	86,03%	287,382	3	1	3	0

TPSA = área de superfície polar total; PM = peso molecular; logP = coeficiente de partição.

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

6 Discussão

O presente estudo dedicou-se a investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante da amida tiofênica sintética inédita, a MFTA, em aorta isolada de rato. E observou-se que a MFTA parece inibir do influxo de Ca^{2+} por meio do bloqueio dos Ca_v1 , mecanismo este que induziu o relaxamento da artéria aorta torácica de ratos Wistar. Além disso, os estudos *in silico* de docking molecular corroboraram os resultados dos experimentos funcionais, bem como estudos computacionais complementares demonstram a segurança da amida através da baixa toxicidade, e também uma alta biodisponibilidade oral.

Diversas camadas de células musculares lisas estão sobrepostas e contidas nas paredes de vários órgãos ou mesmo em tubos do corpo, incluindo, estômago, intestinos, bexiga, vias aéreas, útero, corpos cavernosos penianos e clitorícos, e vasos sanguíneos. Esses feixes celulares se contraem na pele e na íris fazendo com que pelos fiquem eretos e a lente ocular mude de forma para focalizar a luz na retina, também quando contraídas, as células musculares lisas encurtam, impulsionando o conteúdo luminal do órgão, o encurtamento celular também pode variar o diâmetro de um tubo para regular o fluxo de seu conteúdo, como ocorre com o sangue no interior dos vasos sanguíneos (WEBB, 2003).

As células musculares lisas vasculares (CMLV) são os principais componentes dos vasos sanguíneos, estão localizadas especialmente na túnica média, a camada média da parede vascular. Estas células são essenciais para a função do sangue vascular em condições fisiopatológicas. Em vasos saudáveis, CMLV contribuem para a manutenção do tônus vascular e a regulação do fluxo sanguíneo, de modo que as alterações bioquímicas ou contráteis podem levar ao aparecimento de certas condições patológicas, como aterosclerose ou hipertensão (WEHBE et al., 2020).

Diante disso, experimentalmente modelos de músculo liso possuem relevância na investigação e busca por novas moléculas com finalidade terapêutica ou profilática que venham reestabelecer ou prevenir as funções fisiológicas deste tipo de órgão e como desfecho o processo de construção de saúde do indivíduo. Além disso, conhecendo-se o potencial que há nos produtos sintéticos bioativos, existem diversos estudos investigando a ação destes nos diversos tipos de músculo liso com o intento de destrar novas moléculas para o tratamento de doenças.

Na literatura há alguns estudos que relatam e analisam as atividades farmacológicas de amidas no tecido muscular liso, destacando o efeito relaxante da 2-cloro-*N*-(1-(3,4-dimetoxifenil)propan-2-il)-2-fenilacetamida em músculo liso gástrico de ratos (GLEDACHEVA et al., 2020), o efeito tocolítico da *N*-(4,6-dimetil)-2-piridinil)benzamida em útero de ratas (ROBERT-PIESSARD et al., 1990), o efeito hipotensor da *N*-trans-feruloil-tiramina em ratos normotensos (AMARO et al., 2014). Além do efeito vasorrelaxante de benzanilidas em aorta de cobaia (BRUNHOFER et al., 2008), das alcamidas piplartina em aorta de rato (SILVA, 2009), piperina e piperdardina em aorta de rato (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2011), de taberniacinas em aorta torácica de ratos (HIRASAWA et al., 2019) e, por fim, da amida sintética (R,Z)-18-((1S,4S)-5-metil-2,5-diazabicyclo[2,2,1]heptan-2-il)-18-oxooctadec-9-en-7-il-fenilacetato também em aorta torácica de rato (LÓPEZ-CANALES et al., 2022), entre outras.

Como a amida tiofênica sintética foco deste trabalho, MFTA, é uma substância inédita, e como tioamidas são extremamente escassas entre os produtos naturais (LINCKE et al., 2010), além de recentemente, em nosso laboratório, ter sido realizada uma triagem farmacológica em músculos lisos (fásico e tônico), onde foi evidenciado que a MFTA apresentou atividade espasmolítica não seletiva em relação aos órgãos e agentes contráteis testados, sendo esta mais eficaz em aorta de rato comparado ao seu efeito em útero de rata (MOURA; CAVALCANTE, 2020), decidiu-se investigar um possível mecanismo de ação vasorrelaxante da mesma em modelo de aorta torácica de ratos Wistar.

O endotélio vascular é uma monocamada de células endoteliais que constitui o revestimento celular interno das artérias, veias e capilares e, portanto, está em contato direto com os componentes e células do sangue. O endotélio não é apenas uma mera barreira entre o sangue e os tecidos, mas também um órgão endócrino. Controla ativamente o grau de relaxamento e contração, através do controle do tônus vascular, regulando o fluxo sanguíneo (KRÜGER-GENGE et al., 2019).

As células endoteliais são capazes de detectar alterações hemodinâmicas e sinais transmitidos pelo sangue e responder pela liberação de substâncias vasoativas (TESAURO; CARDILLO, 2011). Em condições fisiológicas os fatores relaxantes e contraturantes derivados do endotélio estão em equilíbrio. As células

endoteliais respondem a estímulos, sendo a resposta mais conhecida a liberação de óxido nítrico (NO) através da ativação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) (REINHART, 1994), há outros fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) como a prostaciclina (PGI_2) (GORI, 2018), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (MICHIELS, 2003) e sulfetos de hidrogênio (H_2S) (GOTO; OHTSUBO; KITAZONO, 2018).

Como citado, a principal via de relaxamento no músculo liso vascular ocorre através da liberação de NO nos vasos sanguíneos, isto ocorre por meio da ativação de receptores muscurínicos endoteliais do tipo M_3 . Um receptor do tipo GPCR que está acoplado à proteína $\text{G}_{q/11}$, quando ativado esse receptor irá ativar a via da $\text{PLC}\beta_1$, induzindo um aumento de IP_3 e Ca^{2+} intracelular, o Ca^{2+} irá se ligar a calmodulina e esse complexo ativará a eNOS, uma vez ativada essa enzima irá converter o aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO, e este por ser um gás lipossolúvel irá se difundir pelas membranas celulares até o leito vascular adjacente, promovendo o relaxamento através da gasotransmissão (WYLIE; CHALLIS; BLANK, 1999).

Baseado nisto, inicialmente foi investigado se a amida relaxaria os anéis de aorta sem endotélio funcional, e foi observado que o efeito vasorrelaxante promovido pela MFTA foi independente dos FRDE, uma vez que essa amida relaxou a aorta pré-contraída com fenilefrina de maneira equipotente na presença ($\text{CE}_{50} = 1,1 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ M}$) e na ausência ($\text{CE}_{50} = 1,3 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ M}$) de endotélio funcional (Gráfico 1).

É bem sabido que o processo de contração do músculo liso vascular é intrinsicamente dependente de alterações das $[\text{Ca}^{2+}]_c$, de modo que alterações na condutância dos íons K^+ da membrana plasmática na célula muscular lisa vascular podem influenciar a entrada de Ca^{2+} na célula (BROZOVICH et al., 2016), com isso decidiu-se investigar se o efeito vasorrelaxante da MFTA em aorta de rato se daria em virtude da modulação de canais de K^+ ou dos Ca_v . Uma vez que, são mecanismos importantes que participam dos processos de contração e relaxamento do músculo liso vascular, onde a ativação de canais de K^+ ou o bloqueio de canais de Ca^{2+} promovem relaxamento nesse músculo (WRAY, BURDYGA, NOBLE, 2005).

O acoplamento de excitação-contração do músculo liso vascular é estreitamente ligado ao potencial de membrana (HAEUSLER., 1978), desencadeando o processo de contração com uma despolarização ou induzindo o relaxamento através da hiperpolarização (HAEUSLER., 1983).

Esses dois processos de despolarização e hiperpolarização acontecem através do fluxo de íons transmembranares nas células musculares lisas vasculares, por meio de canais iônicos. Os canais são poros encontrados na membrana, são permeáveis de modo seletivo a cátions como Ca^{2+} ou K^+ ou a ânions como o Cl^- . Estes íons estão em ambos os lados da membrana celular e o influxo ou efluxo ocorre com base no gradiente eletroquímico (FIRTH et al., 2011).

O bloqueio dos Ca_v pode ocorrer de forma direta sobre o canal, como acontece com os bloqueadores da classe das diidropiridinas (nifedipino) ou indiretamente através da ativação dos canais de K^+ (cromacalim), promovendo hiperpolarização e consequente bloqueio dos Ca_v (NAVARRO-GONZALEZ, 2009).

A contração pelo acoplamento eletromecânico ocorre por meio de alterações no potencial de membrana e sua consequência na $[\text{Ca}^{2+}]_c$. O potencial de membrana na célula muscular lisa arterial é negativo em relação ao espaço extracelular, assim como em outras células, de modo que a dilatação e a contração máxima ocorrem em cerca de -60 mV e -30 mV, respectivamente (HARRAZ; HILL-EUBANKS; NELSON, 2020).

Potenciais mais positivos, ou despolarização, podem levar a mudanças conformacionais em canais, fazendo com que ocorra a abertura destes, como nos Ca_v , causando o influxo de Ca^{2+} , consequentemente aumentando a sua concentração citosólica, sendo por fim o gatilho necessário para disparar o processo de contração. Em contrapartida, potenciais mais negativos, levam ao que chamamos de hiperpolarização, como o que ocorre com a abertura de canais de K^+ , consequentemente fechamento dos Ca_v , causando um relaxamento do músculo liso (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Como para ocorrer a ativação e abertura de Ca_v é necessária uma despolarização de membrana, é possível inferir e constatar que qualquer agonista ou substância que gere uma hiperpolarização fará com que haja o fechamento destes canais. Esta hiperpolarização pode ser alcançada por agentes que abram canais de K^+ , consequentemente causando o efluxo deste cátion (GURNEY, 1994).

A ativação dos canais de K^+ de forma direta nas células musculares lisas do leito vascular pode ser considerada como uma via de sinalização, de modo que ao ser ativada, induzirá o relaxamento de maneira independente dos fatores relaxantes derivados do endotélio, produzidos e liberados das células endoteliais (NELSON et al., 1990; SOBEY, 2001; BARBATO, 2005).

A atividade dos canais de K^+ é fator determinante no potencial de membrana das células musculares lisas vasculares, regulando o diâmetro e o tônus vascular. Uma propriedade característica na farmacologia é que fármacos capazes de induzir a abertura desses canais para produzir hiperpolarização, conseguem impedir de modo consistente a contração do músculo liso (WHIDDEN et al., 2016; DOGAN et al., 2019).

Essa característica ocorre por meio de um aumento moderado na concentração extracelular de K^+ , entretanto são ineficazes quando a concentração de K^+ é elevada para níveis mais altos. Isso ocorre pois em elevadas concentrações de K^+ o potencial de membrana da célula muscular lisa fica próximo ao potencial de equilíbrio do potássio, logo o gradiente químico reduz o efluxo deste íon, e então não ocorre a hiperpolarização. Essa característica simples, mas marcante, é uma propriedade que fará a diferenciação entre os ativadores de canais de K^+ dos bloqueadores de canais Ca^{2+} , que apresentam dinâmica oposta (GURNEY, 1994).

Após entendimento dessa dinâmica iônica no comportamento muscular, decidiu-se investigar se o efeito vasorrelaxante da MFTA em aorta de rato estaria envolvendo a ativação dos canais de K^+ ou o bloqueio dos canais de Ca^{2+} .

Nessa perspectiva o órgão foi contraído com aumento moderado na concentração extracelular de K^+ (KCl 30 mM) ou com aumento elevado na concentração extracelular de K^+ (KCl 80 mM). Esse protocolo experimental é simples de ser executado e se baseia nas propriedades eletroquímicas da membrana celular. Assim, um aumento moderado na concentração extracelular de K^+ , reduz o efluxo desse íon e promove uma pequena despolarização na célula muscular suficiente para promover abertura de Cav . No entanto, um elevado aumento na concentração extracelular de K^+ (80 mM), reduz de maneira mais intensa o efluxo desse íon e promove uma grande despolarização, suficiente para abrir uma quantidade maior de Cav . Dessa forma, substâncias ativadoras de canais de K^+ são mais eficientes em promover efeito quando o aumento na concentração

extracelular de K^+ for pequeno e suficiente para que esse íon permaneça saindo da célula para gerar posterior hiperpolarização e consequente relaxamento. As substâncias bloqueadoras diretas de Ca_v são mais eficientes em promover seu efeito quando vários canais de Ca^{2+} se encontram abertos, ou seja, no experimento com elevadas concentrações extracelulares de K^+ (RAUWALD; BREHM; ODENTHAL., 1994; GURNEY, 1994).

Observou-se então neste protocolo que não houve diferença estatística significativa na eficácia ($E_{max} = 95,4 \pm 4,6\%$ e $E_{max} = 98,7 \pm 1,3\%$) da amida, porém sua potência foi aproximadamente duas vezes maior ($CE_{50} = 1,9 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M e $CE_{50} = 8,3 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M) quando a aorta era contraída com 80 mM de KCl (Gráfico 2), não tendo diferença ao efeito da amida quando a contração era induzida por fenilefrina ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M), sugerindo, dessa forma, que o mecanismo de ação da MFTA envolve a modulação negativa dos Ca_v e não ativação dos canais de K^+ .

Semelhante a MFTA, outras amidas, como a piperdardina e piperina (BRUNHOFER et al., 2008, ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2011) e a piplartina (SILVA, 2009) apresentaram atividade espasmolítica em aorta de cobaia e de rato, respectivamente, frente às contrações induzidas por agentes contráteis, eletromecânico (KCl) e farmacomecânico (fenilefrina), e seus mecanismos vasorrelaxantes parecem envolver o bloqueio dos Ca_v .

As contrações induzidas pelo KCl podem ser inibidas por bloqueadores de Ca_v , pela redução do influxo de cálcio (KARAKI; AHN., 1988). Os Ca_v representam a principal via para a translocação de Ca^{2+} através da membrana plasmática, bem como suportam várias funções, incluindo a contração muscular (FUSI et al., 2017). Sabendo-se que os Ca_v constituem a via dominante de influxo celular de Ca^{2+} (CATTERALL; LENAUEUS; GAMAL EL-DIM., 2020), decidiu-se investigar se o efeito vasorrelaxante induzido pela amida estaria relacionado com o impedimento do influxo desse íon pelos Ca_v .

Para estudar essa hipótese foram construídas curvas de contração cumulativas do tipo concentração-resposta ao $CaCl_2$, em meio despolarizante para favorecer a abertura desses canais e nominalmente sem Ca^{2+} , tanto na ausência como na presença de diferentes concentrações da MFTA. O protocolo fundamenta-se no fato de que a contração induzida por $CaCl_2$ acontecerá, de maneira quase

unânime, pelo influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, visto que a despolarização gerada pela alta concentração de K^+ induz abertura dos Ca_v (REMBOLD, 1966).

Nesse protocolo, pode-se observar que a curva cumulativa controle ao CaCl_2 foi deslocada para a direita de maneira não paralela (Gráfico 3), ocorrendo uma diminuição da potência contrátil e do E_{max} na presença da MFTA. Sendo assim, esse resultado comprova a sugestão da hipótese anterior de que a amida exerce o seu efeito vasorrelaxante em aorta torácica de rato por um bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

A partir deste achado experimental, questionou-se qual seria o subtipo de Ca_v que a MFTA estaria bloqueando para exercer o seu efeito vasorrelaxante. Os Ca_v possuem uma classificação própria em virtude de suas características eletrofisiológicas e farmacológicas, sendo agrupados em Ca_v1 ($\text{Ca}_v\text{-L}$), Ca_v2 ($\text{Ca}_v\text{-P/Q}$, N e R) e Ca_v3 ($\text{Ca}_v\text{-T}$). Os dois primeiros grupos são ativados por alta voltagem, enquanto o Ca_v3 é ativado por baixa voltagem, com relação a sensibilidade à substâncias, as duas últimas famílias são insensíveis à di-hidropiridinas, oposto ao grupo Ca_v1 que é sensível a essa classe de compostos (CATTERALL, 2021). No músculo liso vascular os Ca_v1 ($\text{Ca}_v\text{-L}$), especialmente os $\text{Ca}_v1.2$, são considerados como principal via de entrada de Ca^{2+} nas células musculares lisas, portanto os principais mediadores da resposta miogênica do leito vascular (GHOSH et al., 2017).

No experimento realizado, foi observado que a MFTA relaxou de maneira dependente de concentração a aorta de rato quando a mesma era contraída com S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos Ca_v do Ca_v1 (AUGUET et al., 1988; FERRANTE et al., 1989) com uma potência similar ($\text{CE}_{50} = 6,3 \pm 1,6 \times 10^{-5} \text{ M}$) quando a contração era induzida por elevadas concentrações (80 mM) de KCl ($\text{CE}_{50} = 8,3 \pm 0,7 \times 10^{-5} \text{ M}$) (Gráfico 4), levando a sugerir que de fato a amida em estudo altera o influxo de cálcio através do bloqueio dos Ca_v em aorta torácica de rato, especificamente os Ca_v1 ($\text{Ca}_v\text{-L}$).

Um estudo apresentou diversas amidas sintéticas do tipo benzanilidas que passaram por uma modificação estrutural, especificamente os átomos de oxigênio foram substituídos por dois átomos de enxofre formando as amidas denominadas genericamente de ditiobenzanilidas, de modo análogo a síntese da MFTA. Neste estudo os autores sugeriram que as ditiobenzanilidas apresentaram atividade

espasmolítica, através de bloqueio dos Ca_v tanto em artéria pulmonar, como em artéria aorta de rato (BRUNHOFER et al., 2011).

Diferente do observado nesse estudo, outra tioamida, benzopirano-4-carbotioamida, apresentou efeito vasorrelaxante em aorta de rato, através ativação de canais de potássio, sendo mais potente que a cromakalim, a pinacidina, as drogas padrão utilizadas (SATO et al., 1993), por fim e de modo genérico há diversas amidas, como cianoamidas e tioamidas com efeito vasorrelaxante (NAKAJIMA et al., 1994).

Vale destacar que não houve diferença estatística na potência, ao analisar a CE_{50} da amida, quando a aorta era contraída com 80 mM de KCl ou com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, bem como não houve diferença estatística no efeito da MFTA quando a aorta era contraída com 3×10^{-7} M de fenilefrina ou 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644. Os três agentes contráteis citados possuem um passo em comum na via de contração da musculatura lisa vascular, a abertura dos Ca_v , permitindo o influxo de Ca^{2+} , de modo que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ irá causar a contração da musculatura lisa vascular pela via clássica (RATZ et al., 2005). Esses dados em conjunto ratificam que a amida, provavelmente, inibe o influxo de cálcio pelos Ca_v para induzir seu efeito vasorrelaxante.

Há exatos 30 anos, Hirata et al. (1992) descreviam uma outra via de contração do músculo liso, a via de sensibilização ao Ca^{2+} , que é mediada pela pequena proteína G monomérica RhoA e o seu alvo de Rho cinase (ROCK) (LI et al., 2020).

A ROCK pertence ao grupo das proteínas serina/treonina cinases, seu peso molecular é de cerca de 160 kDa, distribui-se por todo o corpo, expressando-se em muitos tecidos (MATSUI; AMANO; YAMAMOTO., 1996). Essa proteína possui duas isoformas, ROCK1 e ROCK2, que possuem 92% similaridade em seus domínios cinase e 65% de homologia em sua sequência de aminoácidos (NAKAGAWA; FUJISAWA; ISHIZAKI, 1996). Ambas as isoformas são amplamente expressas em células musculares lisas vasculares. Além disso, desempenham um papel não apenas em condições fisiológicas, mas também em muitas doenças vasculares, como hipertensão (YAO; CHANDRA; TOQUE, 2013).

A ROCK possui cerca de 15 alvos moleculares (WIRTH, 2010), mas no âmbito da contração do músculo liso o de maior destaque é a fosforilação da

subunidade de ligação à miosina da MLCP, chamada de MYPT-1. Uma vez fosforilada MYPT-1 irá inibir a MLCP, desse modo será evitada a retirada do fosfato da cadeia leve da miosina e assim haverá um aumento da sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} (SECCIA et al., 2020).

Essa via de sinalização é base para o aumento sustentado da tensão gerada por vasoconstritores, como a adrenalina nos vasos sanguíneos, contribuindo para regular a pressão arterial. Evidências crescentes revelam que a via desempenha papel central e complexo no sistema vascular, e que o aumento da atividade de ROCK está associado a uma gama de doenças cardiovasculares, como hipertensão (LI et al., 2019), e de modo paralelo estudos sugerem que a inibição de ROCK normaliza a elevada pressão em ratos (NAGAOKA et al., 2004).

Sabe-se que essa é a via mais importante de sensibilização ao Ca^{2+} , além de ser mencionado anteriormente, que a via pode ser considerada um alvo importante para o desenvolvimento de tratamentos, levantou-se a hipótese de que a MFTA também poderia estar inibindo essa via de sinalização para executar o seu efeito vasorrelaxante em aorta torácica de rato.

Diante disso, a ferramenta farmacológica utilizada foi o Y-27632 (complexo de piridina sintético), um inibidor não seletivo de ROCK, que tem como alvo o sítio catalítico da ROCK, especificamente o domínio cinase dependente de trifosfato de adenosina (ATP) dessa proteína, competindo desse modo com o ATP (LI; LIU, 2019). Nesse protocolo foi possível perceber que na presença desse inibidor, não houve alteração da potência relaxante da amida (Gráfico 5), sugerindo dessa forma que a amida não estaria inibindo a via de sinalização da ROCK para exercer o seu efeito vasorrelaxante.

Em um estudo paralelo a amino-amida ropivacaína induziu uma vasoconstrição em aorta de rato, sendo avaliado o papel da sinalização da ROCK nessa via de contração. A contração gerada pelo composto teste foi reduzida após a adição do Y-27632, sugerindo dessa forma que a amida tem como um dos mecanismos de contração, a via sensibilização ao Ca^{2+} mediado por ROCK (YU et al., 2005).

Portanto, o compilado de protocolos e resultados experimentais nos levam a sugerir que o mecanismo de ação vasorrelaxante da MFTA em aorta torácica de rato se dá por meio da inibição do influxo de Ca^{2+} , especificamente pelo bloqueio

dos Cav1. Como uma forma de complementar e dar maior robustez a este trabalho, buscou-se investigar através de estudos *in silico* se seria possível obtermos resultados que corroborassem com os resultados funcionais.

Estudos *in silico* são estratégias auxiliares na predição ou confirmação de propriedades farmacodinâmicas durante o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, parâmetros farmacocinéticos como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade também podem ser calculados por ferramentas computacionais, como softwares (SANDER et al., 2009; PURATCHIKODY et al., 2016). Esses ensaios ocorrem por meio de plataformas baseadas em bancos de dados, com substâncias conhecidas e, utilizando-se de algoritmos, que são capazes de prever características do composto por similaridade, auxiliando nos estudos farmacológicos de uma nova substância, com redução dos investimentos temporais e financeiros (CHINNASAMY et al., 2018).

O *docking* molecular é um tipo de estudo *in silico* que prediz o melhor modo de ligação entre um ligante e uma macromolécula alvo, de forma que o seu resultado consiste primeiramente no algoritmo de busca, o qual visa identificar a conformação e orientação energeticamente mais favorável do ligante no sítio ativo de um alvo, e por fim a função de pontuação, que é usada para avaliar a energia da ligação, prevendo dessa forma a afinidade do ligante ao alvo, usando como base a teoria de baixa energia entre esses dois compostos. O algoritmo é a parte mais importante para a interpretação e predição correta, de modo que vários algoritmos podem ser propostos sendo um dos mais populares o Moldock (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Com base nos nossos resultados, questionou-se se os estudos de *docking* molecular poderiam confirmar os experimentos funcionais por meio de ensaios computacionais, para isso foi firmada uma colaboração com a Professora Doutora Luciana Scotti, que desenvolve estudos nessa linha de pesquisa no laboratório de quimioinformática da UFPB.

O *docking* molecular do Cav (PDB id: 3G43) e da ROCK (PDB id: 2ETR) foi realizado com a MFTA. Como visto na Tabela 2, os estudos *in silico* corroboram com os ensaios *in vitro* para o bloqueio dos Cav, isso é demonstrado através dos valores energéticos mais negativos da amida (-132,993 kcal/mol e -111,595 kcal/mol) quando comparados ao nifedipino (-81,7718 kcal/mol e

122,982 kcal/mol) para as funções de pontuação Moldock score e Rerank score respectivamente. Em virtude das energias de interação da amida serem inferiores a droga padrão – nifedipino – para hipertensão de origem vascular (TUNG et al., 2022), a amida mostra-se promissora em exercer o efeito vasorrelaxante de modo semelhante.

Para ROCK, os estudos *in silico* foram condizentes com os ensaios *in vitro* na função Rerank score, uma vez que a MFTA (-60,6458 kcal/mol) não apresentou energia mais negativa que o Y-27632 (-73,3509 kcal/mol). Em contrapartida ao ser avaliada a função de pontuação Moldock score, a amida apresentou valor mais negativo (-78,5828 kcal/mol), porém muito próximo, quando comparado ao controle positivo, Y-27632 (-76,8306 kcal/mol). Apesar deste segundo resultado ir de encontro ao que foi observado nos estudos *in vitro*, é importante destacar que os ensaios *in silico* nem sempre são dados confirmativos, sendo pois soberanos os resultados funcionais neste caso.

Além disso, outros parâmetros foram avaliados nos estudos *in silico* dentro aspecto biológico da MFTA, como a sua toxicidade e sua absorção oral. No âmbito da toxicidade os efeitos de mutagenicidade, tumorigenicidade e irritabilidade não foram vistos na análise (Tabela 3), de modo que um fármaco pode ser considerado promissor para uso na terapêutica quando apresenta um adequado equilíbrio entre bons efeitos farmacológicos e baixa toxicidade (MOROY et al., 2012; PIRES et al., 2015).

As propriedades físico-químicas da MFTA como TPSA, PM, logP, nALH, nDLH foram previstas (Tabela 4), a fim de traçar o perfil de biodisponibilidade oral desta substância. Esses parâmetros relacionam-se com a probabilidade de uma substância atuar como composto ativo por via oral, bem como estimam o transporte passivo de membrana, através da permeabilidade, absorção e biodisponibilidade (LIPINSKI et al., 1997; FERREIRA et al., 2018).

A TPSA e a PM são consideradas parâmetros importantes para o transporte passivo através das membranas celulares, influenciando a absorção intestinal, e a passagem pela barreira hematoencefálica de maneira inversamente proporcional, podendo levantar dificuldades na administração oral dessa molécula. De acordo com os resultados, os valores de TPSA e PM previstos para a amida encontram-se

em concordância com os valores estabelecidos por Lipinski (PARDRIDGE, 1995; NAVIA; CHATURVEDI, 1996; LIPINSKI et al., 1997).

Quando são calculados e encontrados valores de logP altos, há um indicativo que a molécula apresenta uma alta lipofilicidade e, por sua vez, uma boa permeabilidade através da membrana plasmática. Sendo assim, pela premissa inicial, os estudos *in silico* revelaram que a MFTA possui logP de acordo com os parâmetros de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997).

É relatado na literatura que tanto o excesso no nALH quanto no nDLH, prejudicam a permeabilidade de um composto através da bicamada lipídica (ABRAHAM et al., 1994; PATERSON et al., 1994). Os valores preditos de nDLH e nALH da MFTA são considerados bons, corroborando estes últimos fatores para a boa permeabilidade teórica dessa amida.

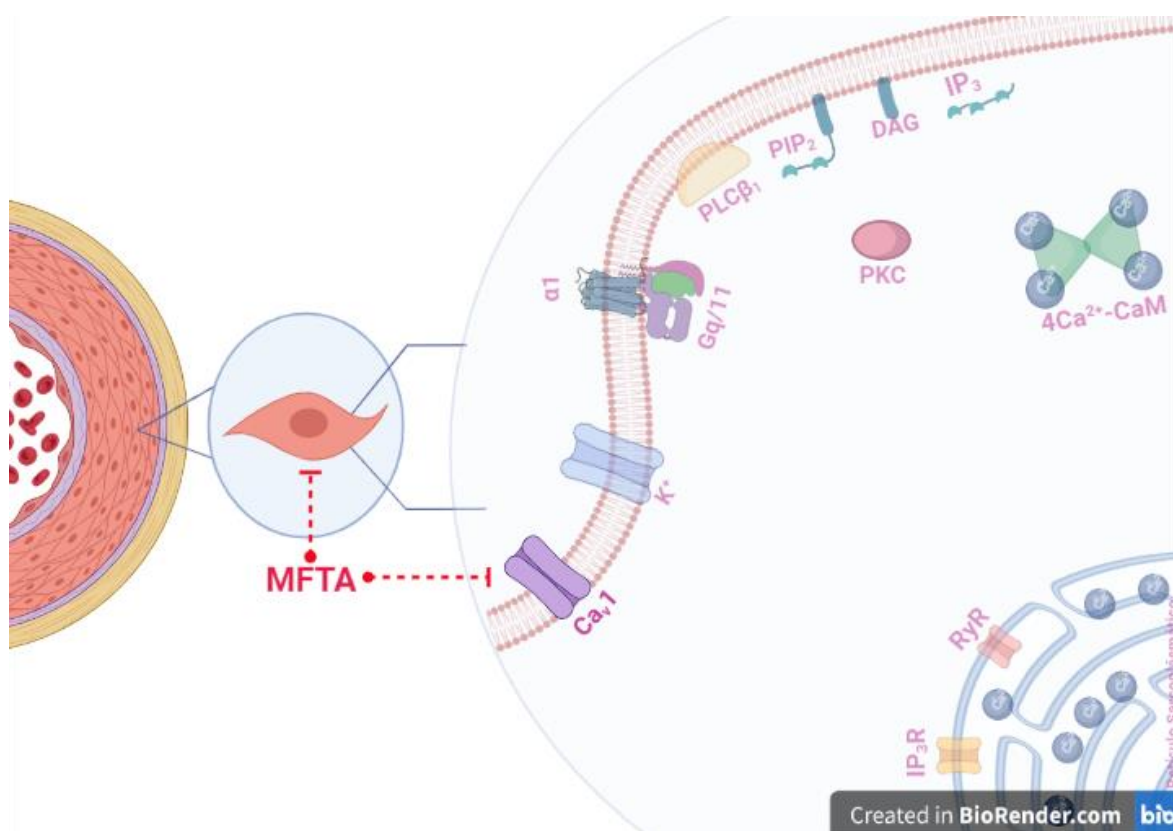
De modo semelhante um trabalho realizado com tioamidas também demonstrou que a regra de Lipinski não foi violada (BRUNHOFER et al., 2011). Por fim destaca-se uma característica de compostos com porções de tioamidas, estes são frequentemente empregados em química medicinal sintética por conferirem maior rigidez e estabilidade molecular contra enzimas do tipo proteases (LINCKE et al., 2010), o que poderia ser um fator extra para justificar a melhor absorção dessas moléculas.

De modo geral, os resultados obtidos nestes estudos *in silico* mostraram que a amida não apresenta toxicidade e que nenhum dos cinco parâmetros físico-químicos preditos para a MFTA violaram a regra de Lipinski, possuindo boa permeabilidade, ou uma alta absorção oral e, por consequência, alta biodisponibilidade (ARIFFIN et al., 2014). Portanto, MFTA poderia ser considerada uma molécula segura e apta para ser administrada pela via oral, de maneira comparativa com outros bloqueadores de Cav, como o nifedipino ou anlodipino. Ou seja, todos estes valores dos parâmetros físico-químicos da MFTA encontram-se dentro da faixa ótima estabelecida por Lipinski, e dessa maneira, esta amida apresenta todos os aspectos elegíveis para que seja considerada uma molécula *drug-like*.

Baseado em todos os resultados, é notável a importância de estudos envolvendo o músculo liso, na tentativa de se conhecer melhor a fisiopatologia de

doenças vasculares, bem como permitir a busca e descoberta de novos fármacos para os seus respectivos tratamentos. A MFTA, apresenta-se como uma nova molécula, cujos estudos devem ser aprofundados na musculatura lisa vascular, visto que, demonstra-se, pela primeira vez, que seu possível mecanismo de ação vasorrelaxante em aorta de rato parece envolver inibição do influxo de cálcio via bloqueio dos Cav do tipo 1 (Figura 15).

Figura 15 – Proposta de mecanismo de ação vasorrelaxante para MFTA em aorta de rato.



A MFTA modula negativamente o influxo de cálcio via Ca_v do tipo 1 (linhas vermelhas pontilhadas). Esse evento culmina com a diminuição da concentração citosólica de cálcio, promovendo o relaxamento do músculo liso em aorta de rato. Ca_v = canal de cálcio dependente de voltagem; K^+ = canais de potássio; Gq/11 = proteína G; $\alpha 1$ = receptor adrenérgico alfa 1; PLC- $\beta 1$ = fosfolipase c do tipo beta 1; PIP_2 : 4,5-bisfosfato de fosfatidil inositol; DAG: diacilglicerol; IP_3 : 1,4,5-trisfosfato de inositol; PKC = proteína cinase dependente de cálcio; CaM: calmodulina; IP_3R : receptor de IP_3 ; RyR: receptor de rianodina.

Fonte: CAVALCANTI-SILVA, 2022.

7 Conclusões

Na avaliação da atividade vasorrelaxante da MFTA em aorta torácica de ratos, pode-se concluir:

- Seu mecanismo de ação vasorrelaxante se dá de forma independente dos fatores relaxantes derivados do endotélio;
- O efeito vasodilatador da MFTA ocorre pela inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem, particularmente os do tipo 1 (Cav1);
- A MFTA nos estudos funcionais parece não modular a proteína ROCK;
- Na caracterização do mecanismo de ação vasorrelaxante da MFTA por meio de *docking* molecular, a amida tanto nas funções de pontuação Moldock e Rerank score parece modular negativamente os Cav1. Em contrapartida no estudo *in silico* para a ROCK, este parece confirmar os resultados *in vitro* apenas quando avaliada a função de pontuação Rerank score.
- Na avaliação dos parâmetros físico-químicos *in silico*, observou-se que a MFTA obedece a regra de Lipinski, bem como, apresenta boa biodisponibilidade oral, e não apresenta toxicidade, demonstrando-se segura para estudos futuros.

Referências

ABRAHAM, M.H.; CHADHA, S.H.; WHITING, G.S.; MITCHELL, R.C. Hydrogen bonding. An analysis of water-octanol and water-alkane partitioning and the delta logP parameter of Seiler. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.83, p. 1085-1100, 1994.

AJAY, M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, v. 74, p. 603 – 612, 2003.

AMARAL, P. A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V. L. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 351, 2003.

AMARO, C. A. B.; GONZÁLEZ-COORTAZAR, M.; HERRERA-RUIZ, M.; ROMÁN-RAMOS, R.; AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; TOTORIELLO, J.; JIMENEZFERRER, E. Hypoglycemic and hypotensive activity of a root extract of *Smilax aristolochiifolia*, standardized on N-trans-feruloyl-tyramine. **Molecules**, v. 19, p. 11366-11384, 2014.

AMARO, C. A. B.; GONZÁLEZ-COORTAZAR, M.; HERRERA-RUIZ, M.; ROMÁN-RAMOS, R.; AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; TOTORIELLO, J.; JIMENEZ-FERRER, E. Hypoglycemic and hypotensive activity of a root extract of *Smilax aristolochiifolia*, standardized on N-trans-feruloyl-tyramine. **Molecules**, v. 19, p.11366-11384, 2014.

AMBERG, G. C.; NAVEDO, M. F. Calcium dynamics in vascular smooth muscle. **Microcirculation**, v. 20, p. 281 – 289, 2013.

ANJOS, A. F.; PERES, A. L. S.; ALCÂNTARA, C. C. S.; FERREIRA, J. C. S. Óxido nítrico e o aumento do desempenho nas atividades físicas com a suplementação de origem vegetal. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, 2021.

ARACHCHIGE, H. S. G.; MUDIYANSELAGE, P. D. H.; VANHECKE, G. C.; PATEL, K.; CHEAITO, H. A.; DOU, Q. P.; AHN, Y. H. Synthesis and evaluation of tiaprofenic acid-derived UCHL5 deubiquitinase inhibitors. **Bioorganic and medicinal chemistry**, v.30, p. 115931, 2021.

ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; RIBEIRO, Ê. A. N.; DA SILVA, S. A. S.; DA COSTA, C. D. F.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; SANTOS, B. V. Cardiovascular effects of two amides (Piperine and Piperdardine) isolated from *Piper tuberculatum* Jacq. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 23, p. 265-274, 2011.

ARIFFIN, A.; RAHMAN, N. A.; YEHYE, W. A.; ALHADI, A. A.; KA-DIR, F. A. PASSassisted design, synthesis and antioxidant evaluation of new butylated hydroxytoluene derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 564-577, 2014.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.

Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advance**, v. 33, p.1582-1614, 2015.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 200-216, 2021.

ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de química; questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5ª ed., Porto Alegre: Ed Bookman, 2012.

AUGUET, M.; DELAFLOTTE, S.; CHABRIER, P. E.; PIROTZKY, E.; CLOSTRE, F.; BRAQUET, P. Endothelin and Ca⁺⁺ agonist Bay K 8644: different vasoconstrictive properties. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 156, n. 1, p. 186-192, 1988.

AZEVEDO, J.; WALTER, F. MolDock Applied to Structure-Based Virtual Screening. **Current Drug Targets**, v. 11, p. 327 – 334, 2010.

BARBATO, J. C. Nicorandil: the drug that keeps on giving. **Hypertension**, v. 46, p. 647–648, 2005.

BARLOW, C. A.; ROSE, P.; PULVER-KASTE, R. A.; LOUNBURY, K. M. Excitation-transcription coupling in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 570, p. 59-64, 2006.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; LIMA, L. M. Natural products as lead compounds in medicinal chemistry. In: Valdir Cechinel-Filho. **Plant Bioactives And Drug Discovery: Principles, Practice And Perspectives**, v. 6, p. 81, 2012.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, 1ª ed., **Editora Artmed**: Porto Alegre, 2001.

BERMAN, H. M. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n.1, p. 235-242, 2000.

BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J. B.; MEYER JR, E. F.; BRICE, M. D.; RODGERS, J. R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCHI, T.; TASUMI, M. The Protein Data Bank: A Computer-based Archival File for Macromolecular Structures. **European Journal of Biochemistry** v. 80, p. 319 – 324, 1977.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanism. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.

BIELSKA, E.; LUCAS, X.; CZERWONIEC, A.; KASPRZAK, J. M.; KAMINSKA, K. H.; BUJNICKI, J. M. Virtual screening strategies in drug design – methods and applications. **Journal of Biotechnology, Computacional Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n.3, p. 249-264, 2011.

BLAKEMORE, D. C.; CASTRO, L.; CHURCHER, I.; REES, D. C.; THOMAS, A. W.; WILSON, D. M.; WOOD, A. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. **Nature Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 383-394, 2018.

BRASIL. **Hipertensão afeta um a cada quatro adultos no Brasil**, Ministério da Saúde, disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/hipertensao-afeta-um-a-cada-quatro-adultos-no-brasil>>, acesso em: 13 maio 2021.

BROZOVICH, F.; NICHOLSON, C.; DEGEN, C.; GAO, Y. Z.; AGGARWAL, M.; MORGAN, K. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. *Pharmacology Review*, v.68, n. 2, p. 476 – 532, 2016.

BRUNHOFER, G.; GRANIG, W. H.; STUDENIK, C. R.; ERKER, T. A journey from benzanilides to dithiobenzanilides: Synthesis of selective spasmolytic compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 994–1001, 2011.

BRUNHOFER, G.; HANDLER, N.; LEISSER, K.; STUDENIK, C. R.; ERKER, T. Benzanilides with spasmolytic activity: chemistry, pharmacology, and SAR. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 5974-5981, 2008.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 8, p. 3947, 2011.

CATTERALL, W. A.; LENAUEUS, M. J.; GAMAL EL-DIM, T. M. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 60, p. 133-154, 2020.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T.P; STRIESSNIG, J. Voltage-gated calcium channels (Cav) in GtoPdb v.2021.3. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2021, n. 3, 2021.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.

CHINNASAMY, P.; ARUMUGAM, R. In silico prediction of anticarcinogenic bioactives traditional anti-inflammatory plants used by tribal healers in Sathyamangalam wildlife Sactuary, India. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, p. 265- 279, 2018

CHOUDHARY, D. K.; KUMAR, M.; PRASAD, R.; KUMAR, V. In Silico Approach for Sustainable Agriculture. **Springer**, 2018.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.

DOGAN, M. F.; YILDIZ, O.; ARSLAN, S. O.; ULUSOY, K. G. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 33, p. 504-523, 2019.

DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDORFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.

ETO, M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, p. 284, 2009.

FEE, R. The cost of clinical trials. **Drug Discovery and Development**, v. 10, n.3, p.32, 2007.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D. J. Binding of A 1, 4-dihydropyridine calcium channel activator, S-(-)-Bay K8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, n. 1, 149-154, 1989.

FERREIRA, L. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, 2015.

FERREIRA, S. B.; DANTAS, T. B.; SILVA, D. F.; FERREIRA, P. B.; MELO, T. R.; LIMA, E. O. In Silico and In Vitro investigation of the antifungal activity of isoeugenol against *Penicillium citrinum*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 2186-2196, 2018.

FERREIRA, S. R. D. Hibiscus sabdariffa L. previne alterações na composição corporal e na função e reatividade das vias aéreas de ratos submetidos a modelo inédito de asma exacerbada pela obesidade: determinação do mecanismo de ação. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, CCS, UFPB, João Pessoa, Paraíba, 2022.**

FIRTH, A. L.; REMILLARD, C. V.; PLATOSHYN, O.; FANTOZZI, I.; KO, E. A.; YAN, J. X. J. Functional ion channels in human pulmonar artery smooth muscle cells: Voltage-dependente cation channels. **Pulmonary Circulation**, v.1, n.1, 2011.

FUKUSHIMA, A. R.; LEONI, L. A. B.; MUÑOZ, J. W. P.; PIPOLE, F.; NETO, N. F. Da química medicinal aos anticorpos monoclonais, como a bioinformática poderá revolucionar a indústria farmacêutica? **BWS Journal**, v. 5, p. 1-7, 2022.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endotelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

FUSI, F.; SPIGA, O.; TREZZA, A.; SGARAGLI, G.; SAPONARA S. The surge of flavonoids as novel, fine regulators of cardiovascular Cav channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, p. 158-174, 2017.

GEN, L.; MINGLIANG, L.; XIANGBING, Q. A brief overview of classical natural product drug synthesis and bioactivity. **Organic Chemistry Frontiers**, v.9. p. 517-571, 2022.

GHALEB, A.; AOUIDATE, A.; BOUACHRINE, M.; LAKHLIFI, T.; SBAI, A. In Silico Exploration of Aryl Halides Analogues as Checkpoint Kinase 1 Inhibitors by Using 3D QSAR, Molecular Docking Study, and ADMET Screening. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 1, p. 84, 2019.

GHOSH, D.; SYED, A. U.; PRADA, M. P.; NYSTORIAK, M. A.; SANTANA, L. F.; NIEVES-CINTRÓN, M.; NAVEDO, M. F. Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. **Vascular Pharmacology - Smooth Muscle**, v. 49, p. 87, 2017.

GLEDACHEVA, V.N.; STEFANOVA, I.D.; SLAVCHEV, V.I.; ARDASHEVA, R.G.; KRISTEV, A.D.; NIKOLOVA, S.A.; SARACHEVA, K.E.; DIMITROVA, D.S. Impact of a Newly Synthesized Molecule (2-chloro-N-(1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-2-yl)-2-phenylacetamide) on the Bioelectrogenesis and the Contractile Activity of Isolated Smooth Muscles. **Folia Medica**, v. 62, p. 532–538, 2020.

GORI, T. Endothelial Function: A Short Guide for the Interventional Cardiologist. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 19, p. 3838, 2018.

GOTO, K.; OHTSUBO, T.; KITAZONO, T. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Hypertension: The Role of Endothelial Ion Channels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 315, 2018.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 242-251, 1994.

HAEUSLER, G. Contraction, membrane potential and calcium fluxes in rabbit pulmonary arterial muscle. **Federation Proceedings**. v. 42, p. 263 – 268, 1983.

HAEUSLER, G. Relationship between noradrenaline induced depolarization and contraction in vascular smooth muscle. **Blood Vessels**, v. 15, p. 46 – 54, 1978.

HARRAZ, O.F.; HILL-EUBANKS, D.; NELSON, M. T. PIP2: A critical regulator of vascular ion channels hiding in plain sight. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, p. 20378 – 20389, 2020.

HARTSHORNE, D. J. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. Physiology of the gastrointestinal tract. **Raven Press, 2nd ed.** p. 423-482, 1987.

HIRASAWA, Y.; DAI, X.; DEGUCHI, J.; HATANO, S.; SASAKI, T.; OHTSUKA, R.; MORITA, H. New vasorelaxant indole alkaloids, taberniacins A and B, from *Tabernaemontana divaricata*. **Journal of Natural Medicines**, v. 73, p. 627–632, 2019.

JÓNSDÓTTIR, S. Ó.; JORGENSEN, F. S.; BRUNAK, S. Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drug and drug candidates. **Bioinformatics**, v. 21, p. 2145-2160, 2005.

JORGENSEN, A. O.; SHEN, A. C.; ARNOLD, W.; MCPHERSON, P. S.; CAMPBELL, K. P. The Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor is localized injunctional and corbular sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. **Journal of Cell Biology**, v. 120, p. 969-980, 1993.

KANG, M.; AN, J. R.; SEO, M. S.; JUNG, H. S.; HEO, R.; PARK, H.; PARK, W. S. Atypical antipsychotic olanzapine inhibits voltage-dependent K^{+} channels in coronary arterial smooth muscle cells. **Pharmacological Reports**, v.73, n. 6, p. 1724-1733, 2021.

KARAKI, H.; AHN, H. Y. Inhibitory effects of procaine on contraction and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscles. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, p. 789-796, 1988.

KERSTEN, R. D.; WENG, J. K. Gene-guided discovery and engineering of branched cyclic peptides in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 115, p. 10961-10969, 2018.

KIM, M.; LEE, J.; LEE, H.; CHANG, S. Significant Self-Acceleration Effects of Nitrile Additives in the Rhodium-Catalyzed Conversation of Aldoximes to Amides: A New Mechanistic Aspect. **Advenced Synthesis and Catalysis**, v. 351, p.1807-1812, 2009.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p.496-511, 2011.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In Bárány, M. (Ed.) **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. San Diego: Academic Press, p. 203-219, 1996.

KROGSGAARDLARSEN, P.; LILILJEFORS, T.; MADSEN, U. A textbook of drug design and development, 2^{sd} ed., **CRC press**: Amsterdan, 1996.

KRÜGER-GENGE, A.; BLOCKI, A.; FRANKE, R. P.; JUNG, F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 7, p. 4411, 2019.

LACINOVÁ, L. Voltage-dependent calcium channels. **General Physiology and Biophysics**, v. 24, p. 78, 2005.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computacional methods for biomolecular “docking”. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 3, p. 402-406, 1996.

LESH, R. E.; NIXON, G. F.; FLEISCHER, S.; AIREY, J. A.; SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Localization of ryanodine receptors in smooth muscle. **Circulation Research**, v. 82, p.175-185, 1998.

LI, B.; WANG, R.; WANG, Y.; STIEF, C. G.; HENNENBERG, M. Regulation of smooth muscle contraction by monomeric non-RhoA GTPases. **British Journal of Pharmacology**, v. 17, p. 3865 – 3877.2020.

LI, F. S.; WENG, J. K. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach, **Nature Plants**, v. 3, p. 17109, 2017.

Li, L.; Liu, B. ROCK inhibitor Y-27632 protects rats against cerebral ischemia/reperfusion-induced behavioral deficits and hippocampal damage. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, p. 3395-3405, 2019.

LI, Q.; WO, D.; HUANG, Y.; YU, N.; ZENG, J.; CHEN, H.; PENG, J. Alkaloids from Nelumbinis Plumula (AFNP) ameliorate aortic remodeling via RhoA/ROCK pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108651, 2019.

LINCKE, T.; BEHNKEN, S.; ISHIDA, K.; ROTH, M.; HERTWECK, C. Closthioamide: An Unprecedented Polythioamide Antibiotic from the Strictly Anaerobic Bacterium *Clostridium cellulolyticum*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 11, p. 2011–2013, 2010.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.23, p. 3–25, 1997.

LIPINSKI, C. F.; MALTAROLLO, V. G.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, A. B. F. Advances and Perspectives in Applying Deep Learning for Drug Design and Discovery. **Frontiers in Robotics and AI**, v. 6, p. 1–6, 2019.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. The role of the mechanical chemist in drug Discovery – then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n.10, p. 853-862, 2004.

LÓPEZ-CANALES, O. A.; PAVÓN, N.; UBALDO-REYES, L. M.; JUÁREZ-OROPEZA, M. A.; TORRES-DURÁN, P. V.; REGLA, I.; PAREDES-CARBAJAL, M. C. Characterization of hypotensive and vasorelaxant effects of PHAR-DBH-Me a new cannabinoid receptor agonist. **The Korean Journal of Physiology and Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 26, p.77-86, 2022.

MACDONALD, J. A.; BORMAN, M. A.; MURÁNYI, A.; SOMLYO, A. V.; HARTSHORNE, D. J.; HAYSTEAD, T. A. Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2419-2424, 2001.

MARIN, J.; ENCABO, A.; BRIONES, A.; GARCIA-COHEN, E. C.; ALONSO, M. J. Mechanisms involved in the vascular cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. **Life Sciences**, v. 64, p. 279-303, 1999.

MARQUES, S.D.N. Estudo fitoquímico de *Sidastrum paniculatum* (L.)fryxell e síntese de amidas análogas às isoladas da família Malvaceae. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, CCS, UFPB**, João Pessoa, Paraíba, 2018.

MARTÍNEZ-PÉREZ, E. F. et al. Natural Antispasmodics: Source, Stereochemical Configuration, and Biological Activity. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-32, 2018.

MATSUI T, AMANO M, YAMAMOTO T. Rhoassociated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 2208–2216, 1996.

MCMURRY, J. Química orgânica: combo. 9ªed, **Editora Cengage Learning**, Brasil, 2016.

MEDEIROS, M. A.A. Mecanismo de ação tocolítica de piplartina, alcanida isolada de *Piper tuberculatum* Jacq., envolve bloqueio de cálcio. 2006. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba.

MICHIELS, C. Endothelial Cell Functions. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, p. 430–443, 2003.

MILLER, W. H. “Perspective: Quantum or classical coherence?”. **The Journal of Chemical Physics**, v. 136, p.1-6, 2012.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORGADO, M.; CAIRRÃO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; VERDE, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 69, p. 247-266, 2012.

MOROY, G.; MARTINY, V.Y.; VAYER, P.; VILLOUTREIX, B.O.; MITEVA, M.A. Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.2, p. 44-55, 2012.

MOURA, T. M. C. F. CAVALCANTE, F. A. Investigação da atividade espasmolítica da amida tiofênica sintética (*E*)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il)acrilamida. In: **XXVIII Encontro de Iniciação Científica, João Pessoa, 2020**.

MURTADA, S. I.; HOLZAPFEL, G. A. Investigating the role of smooth muscle cells in large elastic arteries: A finite element analysis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 358, n. 0, p. 1-10, 2014.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.

NAGAOKA, T. MORIO, Y. CASANOVA, N. BAUER, N. Rho/rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, p. 665-672, 2004.

NAKAGAWA, O.; FUJISAWA, K.; ISHIZAKI, T. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. **FEBS Letters**, v.392, p. 189–193, 1996.

NAKAJIMA, T.; KASHIWABARA, T.; IZAWA, T.; NAKAJIMA, S. Structure-activity studies of N-cyano-3-pyridinecarboxamides and their amide and thioamide congeners. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 20, p. 2485 – 2488, 1994.

NAVARRO-GONZALEZ, M.; GRAYSON, T. H.; MEANEY, K. R.; CRIBBS, L. L.; HILL, C. E. Non L-Type voltage-dependent calcium channels control vascular tone of the rat basilar artery. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, p. 55-66, 2009.

NAVIA, M. A.; CHATURVEDI, P. R. Design principles for orally bioavailable drugs. **Drug Discovery Today**, v.1, p. 179-189, 1996.

NAWWAR, M.A., SWILAM, N.F., HASHIM, A.N., AL-ABD, A.M., ABDEL-NAIM, A.B., LINDEQUIST, U. Cytotoxic isofenolic acidamide from *Myricaria germanica* (Tamaricaceae). **Plant Signaling Behavior**, v.8, n.1, p. 22642, 2013.

NELSON, M. T.; PATLAK, J. B.; WORLEY, J. F.; STANDEN, N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **American Journal of Physiology**, v. 259, p.13 – 18, 1990.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. xxxviii. update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NEWMAN, D. J. Pharmacology and Therapeutics Developing Natural Product Drugs: Supply Problems and How They Have Been Overcome. **Pharmacology and Therapeutic**, v. 162, p. 1 – 9, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**. v. 66, p. 1022, 2003.

NIXON, G. F.; MIGNERY, G. A.; SOMLYO, A. V. Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 15, p. 682-700, 1994.

NORINDER, U.; BERGSTROM, C. A. S. Prediction of ADMET Properties. **ChemMedChem**, v. 1, p. 920-37, 2006.

PARDRIDGE, W.M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.15, p.5-36, 1995.

PARK, J.B. Isolation and characterization of N-feruloyltyramine as the P-selectin expression suppressor from garlic (*Allium sativum*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, 2009.

PARTHASARATHI, R.; DHAWAN, A. In silico approaches for predictive toxicology. In: In Vitro Toxicology. **Academic Press**, p. 91-109, 2018.

PATERSON, D.A.; CONRADI, R.A.; HILGERS, A.R.; VIDMAR, T.J.; BURTON, P.S. A non-aqueous partitioning system for predicting the oral absorption potential of peptides. **Quantitative Structure-Activity Relationships Journal**, v. 13, p. 4-10, 1994.

PIRES, D.E.; BLUNDELL, T.L.; ASCHER, D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

PRAKOESWA, C. R. S.; PURWANTO, D. A.; ENDARYANTO, A. Molecular Docking of Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) on Keap1-Nrf2 Complex Protein in Photoaging Prevention. **Medico-Legal Updat**, v. 20, p. 305 – 311, 2020.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology** (Bethesda, Md.), v. 24, p. 342-356, 2009.

PURATCHIKODY, A.; SRIRAM, D.; UMAMAHESWARI, A.; IRFAN, N. 3-D structural interactions and quantitative structural toxicity studies of tyrosine derivatives intended for safe potent inflammation treatment. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n. 1, p. 24, 2016.

RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium sensitizing stimulus. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, v. 288, p. 769 – 783, 2005.

RAUWALD, W. H.; BREHM, O.; ODENTHAL, K. P. The involvement of a Ca²⁺ channel blocking mode of action in the pharmacology of *Ammi visnaga* fruits. **Planta Medica**, v. 60, p. 101-105, 1994.

RAVINA, E. The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs. **Wiley-VCH**, v. 18, p. 417 – 422, 2011.

REINHART, W.H. Shear-dependence of endothelial functions. **Experientia**, v. 50, p. 87–93, 1994.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány, M. **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. San Diego, Academic Press, 1. ed, p. 227-239, 1966.

ROBERT-PIESSARD, S.; LE-BAUT, G.; COURANT, J.; BRION, J.D.; SPARFEL, L.; BOUHAYAT, S.; PETIT, J.Y.; SANCHEZ, R.Y.; JUGE, M.; GRIMAUD, N.; WELIN, L. Non-acidic anti-inflammatory compounds: activity of N-(4,6- dimethyl-2-pyridinyl) benzamides and derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 9-19, 1990.

RUYCK, J. Molecular docking as a popular tool in drug design, na *in silico* travel. **Advances and Applications In Bioinformatics and Chemistry**, v. 9, p.1, 2016.

SAKAMOTO, K.; HORI, M.; IZUMI, M.; OKA, T.; KOHAMA, K.; OZAKI, H.; KARAKI, H. Inhibition of high K⁺-induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: possible involvement of ROCKs in a signal transduction pathway. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.92, n. 1, 56 – 69, 2003.

Salama, G. Angiotensin II Receptor Blockers and Arrhythmias in Ventricular Hypertrophy. *Journal of the American Heart Association*, v. 11, n. 15, p. 26634, 2022.

SANDER, T.; FREYSS, J.; VON KORFF, M.; REICH, J. R.; RUFENER, C. OSIRIS, na entirely in-house developed drug discovery informatics system. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 232–246, 2009.

SANGI, D.P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SANTOS, B. V. O.; CHAVES, M. C. O.; SILVA, B. A. Efeito espasmolítico da mistura de compostos do tipo amida e propiofenona obtidos das raízes de *Piper marginatum* (PIPERACEAE). In: **XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 1999, Caxambu, MG. XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Caxambu, MG. v. único, p. 292, 1999.

SATO, H.; KOGA, H.; ISHIZAWA, T.; MAKINO, T.; KUROMARU, K.; TAKA, N.; NABATA, H. Vasorelaxant activity of 2-substituted 6-nitro-2H-1-benzopyran-4-carbothioamide K⁺ channel openers. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 12, p. 2627 – 2630, 1993.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, p. 3-9, 2008.

SECCIA, T. M.; RIGATO, M.; RAVAROTTO, V.; CALÒ, L. A. ROCK (RhoA/Rho Kinase) in Cardiovascular-Renal Pathophysiology: A Review of New Advancements. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, p. 1328, 2020.

SEIPLE, I.; ZHANG, Z.; JAKUBEC, P.; LANGLOIS-MERCIER, A.; WRIGHT, P. M.; HOG, D. T.; YABU, K.; ALLU, S. R.; FUKUZAKI, T.; CARLSEN, P. N.; KITAMURA, Y.; ZHOU, Y.; CONDAKES, M. L.; SZCZYPIN´SKI, F. T.; GREEN, W. D.; MYERS, A. G. A Platform for the Discovery of New Macrolide Antibiotics. **Nature**, v. 533, p. 338 – 345, 2016.

SILVA, C. V.; DETONI, Cássia Britto; GUEDES, M. L. S.; VELOZO E. S. alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba*. **Química Nova**, v. 31, p. 2052-2055, 2008.

SILVA, J.L.V. Envolvimento dos canais para cálcio e para potássio na ação vasorrelaxante da piplartina em aorta de rato. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, CCS, UFPB**, João Pessoa, Paraíba, 2009

SILVERTHORN, D.U. Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada. **Editora Artmed**, 7 ed., 2017.

SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 28 – 38, 2001.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. Química Orgânica. **Editora GEN**, vol. 1, 2018.

SOMANI, R.; MADAN, D.; BARVE, P.; BADVE, R. Optimization and study of variables in microwave assisted organiC synthesis of some biologically active chalcones. **Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 153-160, 2017.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiology Review**, v.83, p.1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-236,1994.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159, p. 129-145, 1968.

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

TESAURO, M.; CARDILLO, C. Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. **Acta Physiology**, v. 203, p. 279–286, 2011.

THOMSEN, R. CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 3315-3321, 2006.

TINTORE, M.; VIDAL-JORDANA, A.; SASTRE-GARRIGA, J. Treatment of multiple sclerosis — success from bench to bedside. **Nature Review Neurology**, v. 15, p. 53–58, 2019.

TORRES, P. H. M.; SODERO, A. C. R.; JOFILY, P.; SILVA-JR, F. P. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p. 4574, 2019.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, p. 1217–1220, 2011.

TUNG, Y. C.; LIN, C. P.; HSIAO, F. C.; HO, C. T.; TZYY-JER, H.; CHU, Y. C.; CHU, P. H. Comparative effectiveness of generic nifedipine versus Adalat long-acting nifedipine for hypertension treatment: A multi-institutional cohort study. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 24, p. 621-629, 2022.

TURCONI, J.; GRIOLET, F.; GUEVEL, R.; ODDON, G.; VILLA, R.; GEATTI, A.; HVALA, M.; ROSSEN, K.; GOELLER, R.; BURGARD, A. Semisynthetic Artemisinin, the Chemical Path to Industrial Production. **Organic Process Research and Development**, v. 18, p. 417 – 422, 2014.

TYLER, K. A.; FRANCESCO, M.; PATRICK, G. H. Exploring the Boundaries of “Practical” Syntheses of Complex Natural Product-Based Drug Candidates. **Chemical Reviews**, v. 117, p. 11994-12051, 2017.

USBERCO, J.; SALVADOR, E.; **Química Geral**, 12^a.ed., São Paulo: Saraiva, 2006.

VALERIO, L. G. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 241, p.356-370, 2009.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 606-631, 2009.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 143, p. 299-330, 1963.

VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289–298, 2005.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.

WEHBE, N.; NASSER, S. A.; AL-DHAHERI, Y.; IRATNI, R.; BITTO, A.; EL-YAZBI, A. F.; BADRAN, A.; KOBEISSY, F.; BAYDOUN, E.; EID, A. H. EPAC in Vascular Smooth Muscle Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 5160, 2020.

WERMUTH, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. 2nd ed, **Academic Press**: San Diego, 2003.

WHIDDEN, M. A.; BASGUT, B.; KIRICHENKO, N.; ERDOS, B. T.; UMER, N. Altered potassium ATP channel signaling in mesenteric arteries of old high salt-fed rats. **Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v. 20, p. 58 – 64, 2016.

WIRTH A. Rho kinase and hypertension. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 12, p. 1276-1284, 2010.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, p. 135-143, 2001.

World Health Organization, Cardiovascular diseases (CVDs). Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>, acesso em: 13 maio 2021.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397-407, 2005.

WU, X.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 220, p. 658-663, 1996.

WYLIE, P. G.; CHALLIS, R. A. J.; BLANK, J. L. Regulation of extracellular signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase by G-protein-linked muscarinic acetylcholine receptors. **Biochemical Journal**, v. 338, p. 619-628, 1999.

YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. In silico approaches for predicting ADME properties of drugs. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 10, n. 5, p. 327-338, 2004.

YANG, H.; LOU, C.; SUN, L.; LI, J.; CAI, Y.; WANG, Z.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067-1069, 2018.

YAO, L.; CHANDRA, S.; TOQUE, H. A. Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout. **Cardiovascular Research**, v. 97, p. 509–519, 2013.

YU, J.; TOKINAGA, Y.; KURIYAMA, T.; UEMATSU, N.; MIZUMOTO, K.; HATANO, Y. Involvement of Ca^{2+} sensitization in ropivacaine-induced contraction of rat aortic smooth muscle, v. 103, n. 3, p. 548 – 555, 2005.

YU, M. J.; ZHENG, W.; SELETSKY, B. M. From Micrograms to Grams: Scale-up Synthesis of Eribulin Mesylate. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 1158 – 1164, 2013.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 24, p. 147, 2001.

ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821-870, 2015.

ZHANG, Y. et al. Hydroxycinnamic acid amides from *Scopolia tangutica* inhibit the activity of M1 muscarinic acetylcholine receptor in vitro. **Fitoterapia**, v. 108, p. 9–12, 2016.

Anexos

Anexo 1 – Certidão de aprovação do projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Universidade
Federal da
Paraíba



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da atividade espasmolítica de duas amidas tiofênicas sintéticas", protocolada sob o CEUA nº 8073300419 (ID 000633), sob a responsabilidade de **Fabiana de Andrade Cavalcante e equipe; Indyra Alencar Duarte Figueiredo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 10/05/2019.

We certify that the proposal "Investigation of the spasmolytic activity of two synthetic thiophene amides", utilizing 64 Heterogenics rats (32 males and 32 females), 32 Guinea pigs (males and females), protocol number CEUA 8073300419 (ID 000633), under the responsibility of **Fabiana de Andrade Cavalcante and team; Indyra Alencar Duarte Figueiredo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/10/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2019 a 07/2021**

Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **8 a 10 semanas**

N: **32**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **150 a 250 g**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 10 semanas**

N: **32**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **250 a 350 g**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Cobaias**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **8 a 10 semanas**

N: **32**

Linhagem: **Cavia porcellus - Dunkin-Hartley**

Peso: **300 a 500 g**

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas

João Pessoa, 25 de junho de 2020

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba