

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**GUANILIDRAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS COMO POTENCIAIS FÁRMACOS
ANTI-OBESIDADE: ESTUDOS CINÉTICOS E *DOCKING* MOLECULAR FRENTE À
LIPASE DE *Candida rugosa***

Maceió - AL

2021

GIOVANNI ORTIZ LEONCINI

**GUANILIDRAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS COMO POTENCIAIS FÁRMACOS
ANTI OBESIDADE: ESTUDOS CINÉTICOS E *DOCKING* MOLECULAR FRENTE À
LIPASE DE *Candida rugosa***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Bioquímica e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

**Catálogo na fonte Universidade
Federal de Alagoas Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

L582g Leoncini, Giovanni Ortiz.

Guanilidrazonas e tiossemicarbazonas como potenciais fármacos antiobesidade : estudos cinéticos e *docking* molecular frente à lipase de *Candida rugosa* / Giovanni Ortiz Leoncini. – 2021.

93 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Xavier de Araújo Júnior.

Co-orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) –
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e
Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 82-91.

Apêndice: f. 92.

Anexo: f. 93.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins

57072-970, Maceió-AL, Brasil

Fone: (82) 3214-1144

Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **GIOVANNI ORTIZ LEONCINI** intitulada: "GUANILIDRAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS COMO POTENCIAIS FÁRMACOS ANTI-OBESIDADE: ESTUDOS CINÉTICOS E DOCKING MOLECULAR FRENTE A LIPASE DE *Candida rugosa*", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 5 de março de 2021, às 8h, por meio de videoconferência.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Coorientador (ICF/UFAL)

Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
(IFAL)

Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Ênio José Bassi
(ICBS/UFAL)

*Dedico este trabalho a minha
filha Júlia Lessa Ortiz, que
nasceu no início dessa jornada e
gerou toda força motriz para a
produção desta tese.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Corrado Leoncini e Delia Hilda Ortiz por todo apoio e dedicação no desenvolvimento do meu caráter como ser humano ao longo de 32 anos. Ao meu irmão, Valentino Leoncini por nunca me negar ajuda nos aspectos computacionais para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos relacionando, além da sinceridade como irmão e parceiro desde sempre.

À minha companheira Maria Gabriella, por trazer alento nos momentos mais difíceis e vigor para a conclusão deste trabalho, sempre acreditando no meu potencial e me encorajando a alçar voos mais altos.

Ao meu amigo, Prof. Dr. Edeildo Ferreira por todo apoio desde o início do doutorado, desde discussões a respeito do conhecimento técnico e científico, suas contribuições em análises computacionais de *docking* molecular presente neste trabalho, incluindo nossas conversas informais, que tornaram a rotina de laboratório mais prazerosa e amigável.

Ao meu amigo, Msc. Josiel Nascimento pelo suporte e disponibilidade para auxiliar nos experimentos bioquímicos, além de compartilhar conhecimento científico e proporcionar um ambiente agradável em todos os dias de trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Química Medicinal (LQM) e permitir desenvolver esta pesquisa com liberdade até sua conclusão. Sou grato por guiar de forma sábia através de orientações e sugestões durante os anos de desenvolvimento desta tese.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo pelas sugestões nos momentos de dúvida e todo suporte da estrutura do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LBFI) disponibilizando os materiais e equipamentos necessários para o desenvolvimento das análises bioquímicas desta tese.

Ao Prof. Dr. Thiago Medonça de Aquino pelas dicas e sugestões discutidas em reuniões e seminários do laboratório, contribuindo para o crescimento do grupo, incluindo este trabalho, em organização e conhecimentos no campo da química orgânica sintética.

À equipe do LQM MSc. Paulo Fernando, MSc. Igor Nascimento, Msc. Érica Erlanny, BSc. Kadja Chagas, BSc. Marcone Alcantara, BSc. Nathan Melo (ex-integrante) BSc. Grécia Solórzarno, Vanessa Lima, Gabriel Passos, Ana Beatriz Flor, Manuelle Figueiredo, Nathalia Monteiro, Matheus Gabriel e Dr. Ednaldo Gomes (técnico), por trabalharem conjuntamente com propósito de tornar o ambiente organizado, harmonioso e produtivo para a execução das

pesquisas. Além dos momentos de descontração nas confraternizações, refeições na copa, café no fim de tarde e todo ambiente que pudemos compartilhar de bom humor e parceria.

Às estagiárias, Camilla Lyra e Juliana Guedes por intensificar meus esforços para a conclusão das análises biológicas na reta final deste trabalho, possibilitando a oportunidade de experienciar minha capacidade de transmissão do conhecimento, experimental e teórico, me enriquecendo de habilidades do ensino prático e didático

À CAPES, CNPq e FAPEAL por fomentar minha carreira acadêmica desde minha iniciação científica até o doutorado, permitindo elevar minha produção científica com mais dedicação e entusiasmo.

Fracassar não é cair, é recursar-se a levantar

- Provérbio Chinês

RESUMO

A obesidade está associada ao risco de diabetes tipo 2, hipertensão, doenças coronárias, cerebrovasculares, osteoartrite, apneia do sono e certos tipos de câncer, além do risco de desenvolver depressão, infertilidade, problemas na gravidez e anomalia dos hormônios reprodutivos. Atualmente, a disponibilidade a preços baixos de alimentos gordurosos e o consumo de açúcar, contribui para o aumento da taxa de obesidade, por vezes associados aos sedentarismo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos estavam acima do peso; dentre estes, 650 milhões eram considerados obesos. A lipase pancreática (LP) é uma enzima de fundamental importância para hidrólise de triacilglicerídeos sendo responsável pela hidrólise de 50 a 70% da gordura presente nos alimentos. O Orlistat é um dos poucos medicamentos antiobesidade que reduz a absorção de gordura em até 30% através da inibição da lipase pancreática e gástrica, bloqueando a hidrólise dos triacilgliceróis com subsequente excreção de gordura. Diante dos efeitos adversos e da ausência por medicamentos antiobesidade, esta tese buscou desenvolver novos protótipos inibidores de lipase a partir do arcabouço estrutural de guanilhidrazonas (AGH) e tiossemicarbazonas (TSC). Dentre os 22 compostos AGH avaliados biologicamente, apresentaram potencial de inibição frente a atividade catalítica da lipase de *Candida rugosa*, a maior atividade antilipase foi (*E*)-2-(3,4-diclorobenzilideno)hidrazina-1-carboximida, apresentando IC₅₀ de 11,16 μM e comportamento cinético de inibição competitiva. Contudo, através da técnica de *screening* virtual, foram avaliados um total de 144 compostos, dentre estes, a estrutura inédita planejada (*9E,12E*)-*N*-((2-((*E*)-3,4-diclorobenzilideno)hidrazina)(imino)octadeca-9,12-dienamida, apresentou pontuação encaixe de 73,59. A análise de *docking* molecular mostrou apenas interações hidrofóbicas na região do substrato sugerindo comportamento cinético de inibição competitiva. Por fim, este trabalho apresenta uma nova possibilidade de desenvolvimento de protótipos com arcabouço farmacologicamente aceito, propondo estruturas inéditas, contribuindo para a busca de um candidato eficaz, seletivo e seguro no tratamento da obesidade.

Palavras-chave: Obesidade. Medicamentos antiobesidade. Lipase pancreática. Inibidores de lipase. Guanilhidrazonas. Tiossemicarbazonas.

ABSTRACT

Obesity is associated with the risk of type 2 diabetes, hypertension, coronary, cerebrovascular diseases, osteoarthritis, sleep apnea and certain types of cancer, in addition to the risk of developing depression, infertility, pregnancy problems and anomaly of reproductive hormones. Currently, the low prices of fatty foods and sugar consumption, contributes to the growth of the obesity rate, sometimes associated with sedentary lifestyle. The World Health Organization (WHO) reported that in 2016, more than 1.9 billion adults were overweight; among these, 650 million were obese. Pancreatic lipase (LP) is an enzyme of fundamental importance for hydrolysis of triacylglycerides and is responsible for the hydrolysis of 50 to 70% of the fat present in food. Orlistat is one of the few anti-obesity drugs that reduces fat absorption up to 30% by inhibiting pancreatic and gastric lipase, blocking the hydrolysis of triacylglycerols and subsequent excretion of fat. In point of view of the adverse effects and the absence of anti-obesity drugs, this thesis search to develop new lipase inhibitors prototypes based on the structural framework of guanylhydrazones (AGH) and thiosemicarbazones (TSC). Among the 22 biologically evaluated AGH compounds, the highest antilipase activity was (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylidene)hydrazine-1-carboximide with an IC_{50} of 11.16 μ M and kinetic behavior of competitive inhibition. However, a total of 144 compounds were evaluated using the virtual screening technique, among them, the unprecedented planned structure (*9E,12E*)-*N*-((2-((*E*)-3,4-dichlorobenzylidene) hydrazine)(imino)methyl)octadeca-9,12-dienamide, with a fit score of 73.59, the molecular *docking* analysis showed only hydrophobic interactions in the substrate binding site, suggesting a kinetic behavior of competitive inhibition. Finally, this work presents a new possibility of developing prototypes with a pharmacologically accepted framework, proposing novel structures, contributing to the search for a effective, selective and safe candidate in the treatment of obesity.

Keywords: Obesity. Anti-obesity drugs. Pancreatic lipase. Lipase inhibitors. Guanylhydrazones. Thiosemicarbazones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de digestão de triacilglicerol (TG) na região do duodeno. A) Mecanismo natural de digestão de gordura. B) Mecanismo de ação do Orlistat na digestão de gordura.	26
Figura 2 - Estrutura molecular de Orlistat e Lipstatina	27
Figura 3 - Mecanismo de hidrólise de triacilglicerídeos catalisada por Lipase. A tríade catalítica representada em preto, resíduos do bolso oxiânion em azul e o substrato em vermelho. A) Ataque nucleofílico da hidroxila da serina no carbono carbonílico da ligação éster suscetível. B) Intermediário tetraédrico. C) Intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da água. D) Intermediário tetraédrico. E) Produto e enzima livre.	30
Figura 4 - Derivados indólicos com atividade antilipase: a) Bisindol ; b) Carbazóis.	32
Figura 5 - Éster fenacílico com atividade antilipase.....	33
Figura 6 -Tiazolidinona com atividade antilipase	33
Figura 7 - Benzimidazol com atividade antilipase.	34
Figura 8 - Ácido Isoclorogênico com atividade antilipase.	36
Figura 9 - Compostos polifenólicos Catequina a) e Quercetina (b) com atividade antilipase.	37
Figura 10 - Estilbenos com atividade antilipase.....	38
Figura 11 - Broussonona com atividade antilipase.....	38
Figura 12 - Saponina com atividade antilipase.....	39
Figura 13 - Terpeno com atividade antilipase.	40
Figura 14 - Bactéria e fungo com atividade antilipase . a) Pentaciclina derivado da bactéria <i>Streptomyces sp.</i> b) perciquininas derivado do fungo <i>Basidiomycete stereum complicatum</i> ...	40
Figura 15 - Síntese de obtenção dos compostos AGH	45
Figura 16 - Síntese de obtenção dos compostos TSC.....	46
Figura 17 - Formação da estrutura base das guanilhidrazonas e tiossemicarbazonas	50
Figura 18 - Mecanismo proposto para a síntese das guanilhidrazonas.....	51
Figura 19 - Efeito de inibição em meio reacional do solvente MeOH e DMSO na atividade da lipase <i>C. rugosa</i> para determinação do protocolo do método flourimétrico	52
Figura 20 - Guanilhidrazonas selecionadas como candidatas à potencial atividade antilipase	53
Figura 21 –Inibição dos candidatos com atividade antilipase ([I] = 50 µM)	54
Figura 22 - Novos candidatos à potencial atividade antilipase derivados de LQM 18 para análise à 20µM em meio reacional	55
Figura 23 - Inibição dos candidatos com atividade antilipase ([I] = 20 µM)	56
Figura 24 - Estruturas selecionadas para estudo cinético de IC ₅₀	57

Figura 25 - Curva dose resposta (Log [inibidor] <i>versus</i> % Inibição) de inibição da metade da atividade total (IC ₅₀) de LQM 15, LQM 17 e LQM 18.....	57
Figura 26 - Curva cinética ([MUF-Butirato] <i>versus</i> V _{máx}) de saturação da lipase para determinação da concentração de MUF-Butirato na metade da velocidade máxima (K _M). 58	58
Figura 27 - Transformação algébrica da equação de Michaelis-Mentem em duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (1/V ₀ <i>versus</i> 1/[MUF-Butirato]) para determinação do mecanismo de inibição de LQM 17.....	59
Figura 28 - Diferentes estruturas conformacionais de Lipase Candida rugosa (PDB:1LPN, 1CRL, 1GZ7 e 1TRH).....	61
Figura 29 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para primeira análise de triagem da atividade biológica.....	62
Figura 30 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para segunda análise de triagem da atividade biológica.....	63
Figura 31 - Grupos de moléculas selecionadas para análise de screening virtual.....	65
Figura 32 - Estrutura e score dos derivados do LQM 17 selecionados para análise de <i>screening</i> virtual.....	66
Figura 33 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para derivados do LQM 17 acima de 41,60.....	67
Figura 34 - Tiossemicarbazonas selecionadas para análise de <i>sreening</i> virtual.....	68
Figura 35 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para Tiossemicarbazonas com Score acima de 41.60.	69
Figura 36 - Guanilhidrazonas selecionadas para análise de <i>screening</i> vitural.....	70
Figura 37 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para Guanilhidrazonas com Score acima de 41.60 mais significativos.....	72
Figura 38 - Derivados de LQM 17 com scaffold hidrofóbico planejados para análise de <i>screening</i> vitural.	74
Figura 39 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para derivados do LQM 17 com novos <i>scaffolds</i> acima de 41,60.	75
Figura 40 - Gráfico dos valores de pontuação CHEMPLP de todas estruturas analisadas.....	76
Figura 41 - Ilustração da região de interação do complexo LQM17-1CRL.....	77
Figura 42 - Ilustração da região do sítio ativo de interação do complexo GOL19-1CRL.....	78
Figura 43 – Resíduos de aminoácidos envolvidos na interação do complexo GOL19-1CRL.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de IMC (kg/m^2)	17
Tabela 2 - Valores não alterados de $V_{\text{máx}}$ e aumento da constante K_M na presença e ausência de LQM 17 refletindo no mecanismo competitivo da inibição.	60
Tabela 3 - Pontuação dos complexos formados em diferentes conformações da lipase <i>C.rugosa</i> para validação do algoritmo em <i>Gold Software</i>	62
Tabela 4 - Porcentagem de compostos com faixa de pontuação encaixe CHEMPLP de 40-45 e menor que 40, referentes as duas triagens biológica iniciais.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG	(Ácido clorogênico)
ADME	(Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação)
AGH	(Aminoguanidina hidrazona)
Arg	(Arginina)
Asp	(Aspartato)
C-terminal	(Ácido carboxílico terminal)
DMSO	(Dimetilsufóxido)
EMA	(European Medicines Agency)
FDA	(Food and Drug Administration)
Glu	(Glutamato)
Gly	(Glicina)
His	(Histitina)
IC ₅₀	(Metade da concentração inibitória máxima)
IMC	(Índice de Massa Corporal)
K _M	(Constante de Michaelis-Mentem)
Leu	(Leucina)
LP	(Lipase Pancreática)
LQM	(Laboratório de Química Medicinal)
Lys	(Lisina)
MeOH	(Metanol)
Nm	(Nanômetros)
nM	(Nanomolar)
N-terminal	(Amina Terminal)
OMS	(Organização Mundial da Saúde)
PDB	(Protein Data Bank)
Phe	(Fenilalanina)
S	(Substrato)
Ser	(Serina)
SNC	(Sistema Nervoso Central)
TG	(Triacilglicerol/Triacilglicerídeo)
Trp	(Tryptofano)
TSC	(Tiossemicarbazona)

Tyr	(Tirosina)
U	(Uma unidade de enzima com atividade catalítica)
$V_{\text{máx}}$	(Velocidade Máxima)
μM	(Micromolar)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	Obesidade e Doenças Associadas	20
2.2	A Obesidade na Atual Pandemia	20
2.3	Os Riscos do Tratamento Antiobesidade	23
2.4	Lipase como Alvo Terapeutico da Obesidade.....	25
2.5	Função e Estrutura de Lipases.....	29
2.5.1	Versatilidade estrutural e comportamento cinético	29
2.5.2	Avanços no desenvolvimento de inibidores de lipase	31
2.6	Derivados de AGH e TSC: obtenção e aplicações	41
2.6.1	Obtenção e bioisoterismo clássico	41
2.6.2	Aplicações terapeuticas e biotecnológicas	42
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos Específicos.....	43
4	MATERIAIS E METÓDOS.....	44
4.1	Reagentes e Soluções	44
4.2	Materiais e Equipamentos	44
4.3	Procedimentos Reacionais	44
4.3.1	Método de obtenção dos derivados de (E)-2-benzylidene-hydrazine carboximidamide (AGH).....	44
4.3.2	Método de obtenção dos derivados de (E)-2-benzylidene-hydrazinecarbothioamide (TSC)	45
4.3.3	Avaliação Biológica dos Inibidores frente a Lipase <i>Candida rugosa</i>	46
4.3.3.1	Ensaio Fluorimétricos de Atividade Enzimática com MUF-Butirato.....	46
4.3.3.2	Ensaio Fluorimétricos de Inibição Enzimática com MUF-Butirato	46
4.3.3.3	Ensaio Fluorimétricos de Inibição Enzimática para Determinação das Curvas Dose-Resposta: IC ₅₀ , V _{máx} e K _M	47
4.3.4	Modelagem <i>in silico</i>	47
4.3.4.1	Detalhes Computacionais	47
4.3.4.2	Validação da Lipase em Modelo Cristalográfico	47

4.3.4.3	<i>Docking</i> molecular	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1	Fundamentação Prática e Teórica	49
5.2	Banco de Moléculas (quimiotéca) e Síntese dos Potenciais Inibidores de Lipase	49
5.2.1	Síntese dos Derivados de Guanilhidrazonas	50
5.3	Avaliação Biológica dos Potenciais Inibidores de Lipase	51
5.3.1	Avaliação da Influência do Solvente na Atividade Biológica.....	51
5.3.2	Atividade Antilipase das Guanilhidrazonas Frente a Lipase <i>Cândida rugosa</i>	53
5.3.4	Determinação do Valor Cinético de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ de LQM 17	58
5.4	Modelo Computacional para Novos Candidatos Potencialmente Promissores..	60
5.4.1	Validação <i>Gold Software</i> dos Algoritmos para de Lipase <i>C.rugosa</i>	60
5.4.2	Planejamento e <i>Screening</i> Virtual de Novas Estruturas	64
5.4.3	<i>Screening</i> Virtual de derivados do LQM 17 pelo <i>Software Gold</i>	65
5.4.5	<i>Screening</i> Virtual de Guanilhidrazonas pelo <i>Software Gold</i>	69
5.4.6	<i>Screening</i> Virtual de derivados do LQM 17 com novos <i>scaffolds</i> pelo <i>SoftwareGold</i>	72
5.4.7	<i>Docking</i> molecular dos candidatos promissores LQM 17 e GOL 19.....	77
6	CONCLUSÃO	80
7	PERSPECTIVAS	81
APÊNDICE - Capítulo de livro sobre os estudos de compostos com potencial interação em diferentes tipos de lipases.....		92
ANEXO – Artigo: Avaliação de derivados de AGH como inibidores de lipase para aplicação biotecnológica.....		93

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública que afeta países desenvolvidos e em desenvolvimento. Está é caracterizada por aumentos anormais no tamanho dos adipócitos; a obesidade também está associada a vários distúrbios patológicos (HOON *et al.* 2012). É uma condição complexa que possui muitos fatores contribuintes, incluindo genéticos, ambientais, sociais, psicológicos e outros, alguns dos quais estão fora do controle do indivíduo (DOWNEY *et al.* 2008). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que a taxa global de obesidade quase triplicou desde 1975. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos estavam acima do peso; entre estes, 650 milhões eram obesos. No mesmo ano, 41 milhões de crianças menores de cinco anos e 340 milhões de crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos estavam com sobrepeso ou obesidade (WHO, 2019).

Atualmente, a obesidade é definida pelo índice de massa corporal (IMC). No entanto, este não deve ser considerado como o principal fator (DOWNEY *et al.* 2008). O IMC é calculado usando altura e peso, e os pacientes são classificados como baixo peso, peso normal, sobrepeso ou obesidade; o último é definido como IMC maior ou igual a 30 kg/m² (**Tabela 1**) (WONG *et al.* 2013). Exceções saudáveis raras incluem atletas treinados que podem atingir IMC acima de 30 (HAN *et al.* 2006). De acordo com a *American College of Physicians* (Escola Americana de Médicos) nos Estados Unidos da América, a terapia farmacológica é uma alternativa para pacientes obesos que falharam em alcançar perda de peso adequada apenas por meios não farmacológicos, incluindo dieta e exercício físico (HOON *et al.* 2012).

Tabela 1 - Classificação de IMC (kg/m²)

Classificação	IMC (kg/m²)
Abaixo do Peso	< 18,5
Peso Normal	18,5 – 24,9
Sobrepeso	25 – 29,9
Obesidade (Classe 1)	30 – 34,9
Obesidade (Classe 2)	35 – 39,9
Obesidade Extrema (Classe 3)	≥ 40

Fonte: AUTOR, 2021. Adaptado de WONG, 2013

Estudos constataram consistentemente que a atividade física reduz ou elimina os riscos associados à obesidade. O estilo de vida sedentário que acompanha a obesidade promove o desenvolvimento de doenças crônicas, morbidades e mortalidade (DOWNEY *et al.*, 2008; O'DONOVAN *et al.*, 2009). Pessoas obesas são predispostas a várias doenças, mediadas principalmente pelo acúmulo de gordura no tecido adiposo visceral (PORTER *et al.* 2009).

Embora a perda de peso seja um resultado importante no tratamento, um dos principais objetivos do manejo da obesidade, é o controle dos fatores de risco cardiovascular e metabólico. (PI-SUNYER, 2015; GLANTD, 2011). Um estudo de 10 anos com homens e mulheres de IMC equivalente a 30kg/m² foi comparado com aqueles de IMC normal, relatando aumento significativo da gravidade de pacientes com comorbidades associadas. A Sociedade da Obesidade concluiu que a obesidade causa comprometimento funcional e redução da qualidade de vida, considerada doença grave de alto índice de mortalidade (PI-SUNYER, 2015).

Os medicamentos para o tratamento da obesidade teve seu início na década de 1920 com o hormônio da tireoide sintético, quando administrados por pacientes eutireoidianos obesos, no qual apresentavam efeitos colaterais significativos associados ao hipertireoidismo (COLMAN, 2005). Atualmente, a farmacoterapia antiobesidade é considerada como adjuvante da dieta e modificação comportamental para facilitar a perda de peso ou promover manutenção de peso a longo prazo. Vários agentes de emagrecimento aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para controle de peso, foram suspensos devido a falta de eficácia e segurança (UMASHANKER, 2016; KUMAR, 2015)

O tratamento de pacientes obesos através do mecanismo molecular baseado na inibição da lipase pancreática e gástrica, atualmente apresenta eficiência na redução de gordura em proporção significativa, principalmente em pacientes que desenvolveram comorbidades (BORGSTRÖM *et al.*, 1988; CURRAN *et al.*, 2004). Este medicamento, aprovado em 1998 para uso a longo prazo, chamado Orlistat[®], atua reduzindo a absorção de gordura em até 30%, através do mecanismo de inibição das lipases, apresentando efeitos adversos toleráveis devido aos níveis reduzidos de vitaminas A, D, E e betacaroteno que são administrados juntamente com suplementos multivitamínicos (GLANTD, 2011).

Desta forma, a escassez de medicamentos antiobesidade apresenta um novo desafio para pesquisadores que trabalham no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A partir deste fato, o presente trabalho mostra uma compilação da literatura de compostos inibidores de lipase: derivados indólicos, ésteres, derivados tiazólicos, derivados imidazólicos, compostos fenólicos, saponinas, terpenos, panciclina e periquinina, apresentando perspectivas atuais do potencial de ação de estruturas sintéticas e de fontes naturais. Por fim, este trabalho trás uma nova

contribuição para o meio científico nesta direção, revelando um arcabouço estrutural inédito para inibidores de lipase. As classes de moléculas de AGH e TSC apresentam uma estrutura química versátil para a adição de diversos substituintes, e alto potencial de inibição, sendo assim, o planejamento racional destas estruturas permitiram corroborar para o banco de dados de candidatos promissores a fármacos antiobesidade.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Obesidade e Doenças Associadas

A obesidade está associada ao risco de diabetes tipo 2, hipertensão, doenças coronárias e cerebrovasculares, osteoartrite, apneia do sono e certos tipos de câncer (PORTER *et al.*, 2009; BLACKBURN *et al.*, 1980). A obesidade também pode estar associada à depressão, infertilidade, problemas relacionados à gravidez e anomalias relacionadas aos hormônios reprodutivos (BLACKBURN *et al.* 1980).

Durante uma década, um estudo envolvendo pacientes obesos de ambos os sexos revelou um risco aumentado de diabetes, cálculos biliares e hipertensão em mulheres, enquanto que nos homens os resultados mostraram um risco aumentado de doenças cardíacas e derrame, bem como diabetes, cálculos biliares e hipertensão (PI-SUNYER, 2009). Atualmente, a maioria dos institutos médicos em todo o mundo reconhece a perda de peso e as atividades físicas como os melhores métodos de prevenção e tratamento da obesidade (HOON *et al.*, 2012; PI *et al.* 2009).

A perda de peso de aproximadamente 5% do peso corporal inicial, pode levar a melhorias na pressão sanguínea, concentrações séricas de lipídios, aumento da sensibilidade à insulina e melhora dos níveis de glicose. A perda de peso também está associada a uma redução significativa no risco de diabetes (PI-SUNYER *et al.* 2009). Em um estudo randomizado envolvendo pacientes com diabetes tipo 2, os pacientes perderam uma média de 8,6% do peso corporal em 12 meses, resultando em perda de peso clinicamente significativa associada ao melhor controle do diabetes e redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (GLANDT *et al.*, 2011)

2.2 A Obesidade na Atual Pandemia

Recentemente, um número crescente de artigos científicos estão sendo publicados correlacionando a obesidade com a atual pandemia do novo Coronavírus (COVID-19), no qual os sintomas do vírus são agravados em pacientes de sobrepeso ou obesidade. Tal fatalidade relacionado a infecção por vírus, foi relatado em 2009 com o vírus influenza H1N1, foi registrado uma porcentagem significativa de entradas a hospitais e mortalidade devido a obesidade dos pacientes, estimado em cerca de 151.700 à 575.400 mortes (HUSSAIN *et al.*; 2020). Pacientes com obesidade classe 3 (IMC \geq 40) apresentaram maior risco de morte, estes

pacientes devem ser cuidadosamente monitorados, administrando agentes antivirais de forma rápida (LOUIE *et al.*, 2010).

Atualmente, o novo vírus está rapidamente espalhando-se pelo mundo, causando alta morbidade e mortalidade. Este surto foi declarado oficialmente pela OMS como uma pandemia que representa um enorme desafio para o sistema de saúde global e a economia (RITTER *et al.*, 2020). COVID-19 já emergiu afetando quase 35 milhões de pessoas em 30 de setembro de 2020, onde o maior número de casos confirmados foi na Índia, EUA e Brasil (JAYAWARDENA *et al.*, 2020). Conforme os dados da OMS de 12 de fevereiro de 2021 foram confirmados no mundo 107.423.526 casos confirmados de COVID-19 e 2.360.280 mortes. O órgão afirma que algumas vacinas candidatas contra a COVID-19 receberam autorização para uso emergencial em alguns países, como o Brasil, no entanto as medidas preventivas ainda são necessárias para controlar a pandemia e diminuir os impactos na saúde, economia e sociedade (<https://www.paho.org/pt/covid19>).

Este problema de saúde pública global se torna desastroso quando associado a uma grande epidemia, a obesidade. O aumento dramático na prevalência da obesidade representa outro desafio global urgente, no qual nas últimas décadas, se tornou uma grande epidemia na maioria dos países industrializados. A porcentagem de crianças e adultos com sobrepeso dobrou, e até triplicou em adolescentes nas últimas três décadas (RITTER *et al.*, 2020). Conseqüentemente, está bem documentado que a obesidade está associada a um risco aumentado bem como a piora em doenças infecciosas com aumento de complicações, hospitalização prolongada, e doenças críticas elevadas (RITTER *et al.*, 2020)

Contudo, existe uma limitação para discussão a respeito de pacientes obesos portadores do vírus, pois uma parte dos protocolos seguidos em hospitais não registram dados de peso corporal e altura que são usados para estimar a massa do tecido adiposo por cálculo do IMC (STEFAN *et al.*, 2020). Além disso, variações de dados são possivelmente atribuíveis a diferenças nas unidades de saúde e fatores de risco, como sexo, idade, doenças crônicas e outras condições de saúde subjacentes (JAYAWARDENA *et al.*, 2020). No entanto, apenas foi possível relatar casos isolados com baixo número de população, relacionando as comorbidades causadas pela obesidade e os desafios encontrados em pacientes obesos.

Em 23 de março de 2020, pacientes diagnosticados com COVID-19 na região de Seattle (EUA) tiveram os dados de IMC corretamente registrados, permitindo o estudo descritivo. Foram registrados uma pequena amostra de 24 pacientes (63% homens): 3 pacientes com IMC normal, 7 com sobrepeso, 13 com obesidade e 1 sem dados de IMC. Embora as análises estatísticas tenham pequeno número de população, foi possível observar que 85% dos pacientes

com obesidade necessitaram ventilação mecânica e 62% dos pacientes com obesidade morreram. Enquanto que pacientes não obesos 64% não necessitaram de ventilação mecânica e 36% morreram (BHATRAJU *et al.*, 2020).

Em geral, diversos relatos de pacientes com COVID-19, exigem suporte respiratório avançado, principalmente obesos pois acomete os volumes pulmonares, funções e expansões. Em Lille na França, foram apresentados dados de 124 pacientes com COVID-19, a necessidade de ventilação mecânica invasiva foi associado à obesidade classe 2 e 3 ($IMC \geq 35\text{kg/m}^2$) como fator independente de outras comorbidades. Acredita-se que os parâmetros que comprometem o paciente incluam problemas respiratórios, aumento da resistência das vias aéreas, baixa força muscular respiratória e volume dos pulmões (HUSSAIN, *et al.*, 2020). Em Shenzhen na China, foi relatado pacientes com pneumonia grave portadores de COVID-19 associado ao sobrepeso e a obesidade, cerca de 86% e 142% maior que pacientes de peso normal, respectivamente (BHATRAJU *et al.*, 2020).

Além de causas respiratórias, as comorbidades causadas pela obesidade também são evidenciadas em diversos casos. O Centro de Controle de Doenças (CCD) dos Estados Unidos registraram em seu Relatório Semanal de Morbidez e Mortalidade que no período de 1 a 30 de março de 2020, 12% de 1.482 pacientes hospitalizados com COVID-19 tinham uma ou mais condições subjacentes: hipertensão (49,7%), obesidade (48,3%), doença pulmonar crônica (34,6%), diabetes mellitus (28,3%) e doenças cardiovasculares (27,8%) (FINER *et al.*, 2020). Estudos na China mostraram que chineses portadores de comorbidades acima de 65 anos foram afetados gravemente, a maior taxa de letalidade foi encontrada para doenças cardiovasculares (10,5%), diabetes *mellitus*, (7,3%), seguido por doenças respiratórias crônicas (6,3%), hipertensão (6,0%) e câncer (5,6%), sendo as três primeiras associadas a doenças metabólicas causadas pela obesidade (STEFAN *et al.*, 2020). Um estudo realizado entre março e junho de 2020 descreveu a associação da obesidade e comorbidades para pacientes com COVID-19, foram 417 amostras de pacientes internados no hospital Al Kuwait em Emirados árabes (Dubai), constatando a hipertensão como a comorbidade mais significativamente associada à obesidade e maior fator de risco para pacientes portadores do vírus (HEIALY *et al.*, 2020).

Deste modo, a obesidade é um fator importante a ser considerado pelo desenvolvimento de comorbidades, como também por atuar prejudicialmente em funções fisiológicas e metabólicas, sendo mais uma adversidade a ser enfrentada por hospitais e órgãos de saúde. Uma análise de internações no hospital acadêmico de Nova York mostrou que entre 4.103 pacientes com COVID-19, a idade avançada foi o principal fator de hospitalização seguido de obesidade extrema ($IMC \geq 40\text{ kg/m}^2$) independente de outra variável (BHATRAJU *et al.*, 2020). Apesar

de estudos recentes e apresentando limitações, os resultados são notáveis no que abrange a relação da obesidade, as comorbidades e os vírus COVID-19, no qual pacientes obesos afetam-se ainda mais apenas pelo fator obesidade, sem outras variáveis de desenvolvimento de comorbidade. Por outro lado, o isolamento social adotado pela OMS como o melhor recurso para desacelerar o número de contágio pelo vírus, contribuiu para o sedentarismo, considerado como um dos parâmetros do desenvolvimento de sobrepeso e obesidade.

2.3 Os Riscos do Tratamento Antiobesidade

Atualmente, a urbanização na maior parte do mundo levou a mudanças nos hábitos alimentares da sociedade (POPKIN *et al.*, 2001; HEALTH *et al.*, 2004). O aumento no consumo de alimentos gordurosos, juntamente com uma diminuição no consumo de cereais e fibras, contribuiu para o aumento das taxas de obesidade, em alguns casos associados a estilos de vida sedentários (ABETE *et al.*, 2006). Nas últimas décadas, produtos alimentares ricos em açúcar e gordura se tornaram mais disponíveis com preços baixos e sabores atraentes. A gordura é o macronutriente mais denso e abundante em termos de energia, comparado aos carboidratos e proteínas (SCHAUWEN *et al.*, 2000). Influências ambientais, incluindo estilos de vida sedentários e consumo de dietas ricas em calorias, causam um desequilíbrio entre gasto e consumo de energia (ABETE *et al.*, 2006).

A predisposição genética da obesidade envolve a ingestão e a redução do gasto de energia, as quais podem ocorrer por taxas reduzidas de metabolismo basal, oxidação de macronutrientes, adipogênese alterada, desvios da ingestão de alimentos, perfil hormonal e termogênese (MARTI *et al.*, 2004). Apesar de fatores genéticos desempenharem um papel essencial, fatores psicológicos, sociais e ambientais são parâmetros mais comuns responsáveis pela atual epidemia de obesidade (KEMPER *et al.*, 2004).

Em geral, as dietas hiperlipídicas desempenham um papel crucial na prevalência da obesidade, interrompendo o balanço energético acumulado da gordura; isso tem implicações para a saúde pública na forma de expectativa de vida reduzida (HEALTH *et al.*, 2004; SCHAUWEN *et al.*, 2000). Portanto, abordagens nutricionais que envolvem o controle da ingestão de lipídios, proteínas e carboidratos são estratégias frequentemente usadas para controlar a obesidade (ABETE, *et al.*, 2006).

A cirurgia bariátrica tem sido útil no tratamento da obesidade mórbida. Chakhtoura e colaboradores (CHAKHTOURA *et al.*, 2017) investigaram a perda média de peso em 22.904 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica; os autores relataram uma melhora de 61% no

diabetes, hiperlipidemia, hipertensão e apneia obstrutiva do sono e uma diminuição no risco de morte prematura. No entanto, a cirurgia bariátrica causa várias complicações. Bikram e colaboradores (BAL *et al.*, 2012) relataram deficiências de vitaminas em um estudo de 318 pacientes seguidos por 12 meses após a cirurgia: deficiência de vitamina A (11%), vitamina C (34,6%), vitamina D (7%), tiamina (18,3%), riboflavina (13,6%), vitamina B6 (17,6%) e vitamina B12 (3,6%).

Algumas terapias farmacológicas são recomendadas antes e após a cirurgia, dependendo dos efeitos colaterais dos medicamentos e do perfil de tolerância do paciente. Essas terapias podem ser desenvolvidas de várias maneiras, como inibição da lipase, supressão da ingestão de alimentos, estimulação do gasto de energia, inibição da diferenciação de adipócitos e regulação do metabolismo lipídico (HOON *et al.*, 2012; SNOW *et al.*, 2005).

As drogas anti-obesidade auxiliam as intervenções no estilo de vida, facilitando a perda de peso e promovendo a manutenção do peso a longo prazo (ABETE, 2006; UMASHANKER, 2016). Para pacientes com obesidade severa (classe III), vários medicamentos, além da cirurgia, podem ser considerados, aumentando os riscos gerados pelos efeitos adversos dos medicamentos, somados à fraqueza pós-cirúrgica (UMASHANKER *et al.*, 2016). Os medicamentos são tipicamente caracterizados por efeitos colaterais no sistema gastrointestinal, rins, sistema nervoso central e cardiovascular. Como resultado, vários medicamentos anti-obesidade foram retirados do mercado (por exemplo, sibutramina, rimonabant e fentermina) ou suspensos devido ao seu perfil de segurança duvidoso, somente o medicamento orlistat, baseado no mecanismo molecular de inibição das lipases, permaneceu em uso a longo prazo, apesar da eficácia moderada (KUMAR *et al.*, 2015).

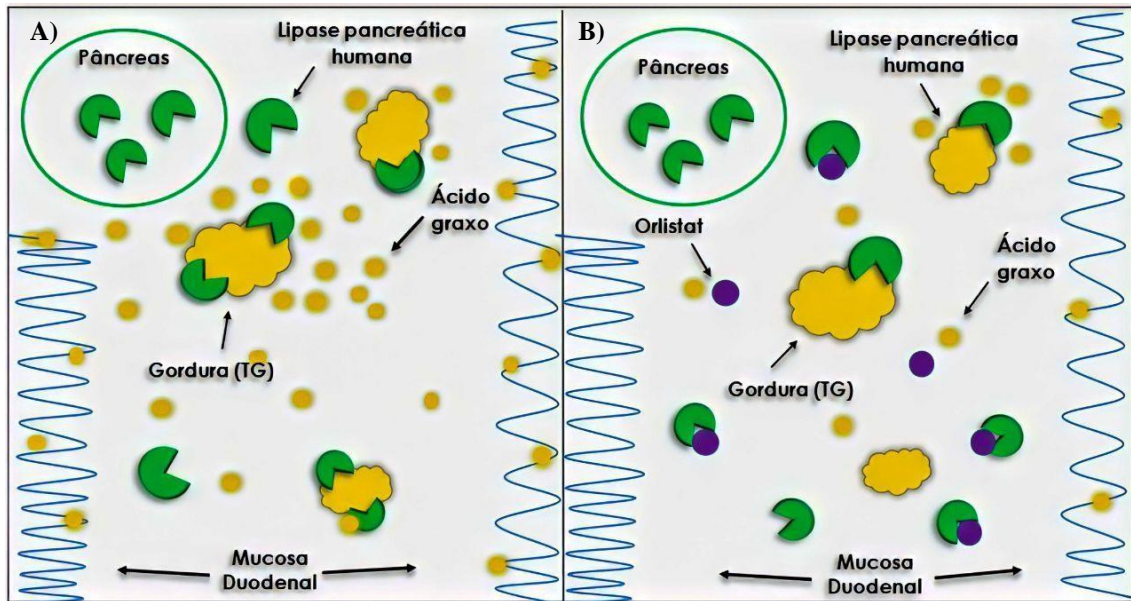
A lipase pancreática (LP) é uma enzima de fundamental importância para a digestão eficiente de triacilglicerídeos. Após a ingestão de alimentos, a lipase gástrica atua no estômago e é responsável pela hidrólise de 15 a 20% dos lipídios da dieta (LOWE *et al.*, 2002). A digestão dos lipídios no intestino é concluída pela mistura com suco pancreático, onde a LP tem um desempenho superior em relação à hidrólise de triacilglicerídeos de cadeia longa e é responsável pela hidrólise de 50 a 70% da gordura presente na comida (LOWE *et al.*, 2002; GARZA *et al.*, 2011). Essa digestão eficiente de gordura é o resultado da formação de micelas com sais biliares, em que as propriedades das partículas da emulsão criam uma interface lipídica-água que gera o ambiente mais favorável para a ação da LP (GARZA, *et al.*, 2011; ALOWE *et al.*, 1994). Estudos com triacetina demonstraram que ocorre um aumento abrupto da atividade catalítica da LP em ambientes lipídeo-água, principalmente após a formação de micelas (ALOWE *et al.*, 1994).

2.4 Lipase como Alvo Terapêutico da Obesidade

Em 1998, a FDA (Food and Drug Administration) aprovou orlistat, comercializado como Xenical[®] para terapia anti-obesidade. Este medicamento reduz a absorção de gordura em até 30% através da inibição do seu alvo terapêutico, a lipase pancreática e gástrica, possuindo um valor de IC₅₀ de 0,34 µM por meio de um modo de ação irreversível (WEILBEL *et al.*, 1987; BORGSTRÖM *et al.*, 1988; FDA, 2019). O orlistat liga-se covalentemente ao Ser153 no sítio ativo da lipase, bloqueando a hidrólise dos triacilgliceróis com subsequente excreção de gordura nas fezes, bloqueando assim 1/3 da absorção de gordura (HENNESS *et al.*, 2006; CURRAN *et al.*, 2004) (**Figura 1**).

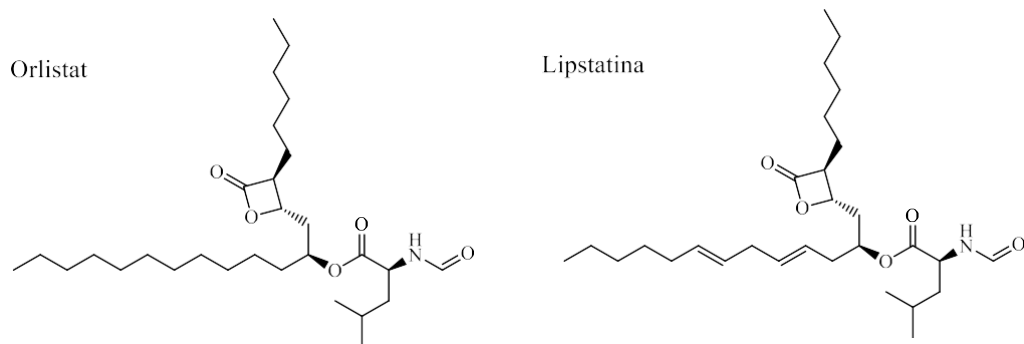
O princípio ativo do orlistat é a tetrahidrolipstatina, derivado hidrogenado da lipstatina que tem origem microbiana produzida por *Streptomyces toxytricini*, isolada pela primeira vez por método fermentativo pelos cientistas da empresa Hoffman-LaRoche. A lipstatina é caracterizada por atividade inibidora irreversível seletiva e potente contra a lipase pancreática, com um IC₅₀ de 0,14 µM (WEIBEL *et al.*, 1987; HADVÁRY *et al.*, 1986). Nos primeiros experimentos, o rendimento de lipstatina foi de 47,17 µg/g (PENG *et al.* 2008) mas após aprimoramento dos métodos de produção e obtenção de lipstatina, os pesquisadores foram capazes de obter concentrações mais altas, variando de 885 a 4208 µg/mL (PENG *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2014). Recentemente, foi isolado lipstatina a partir de *Streptomyces virginiae*, segundo com a norma taxonômica atual, ambas as espécies bacterianas pertencem ao cluster fenotípico *Streptomyces lavendulae* (SLADIČ *et al.*, 2014).

Figura 1 - Esquema de digestão de triacilglicerol (TG) na região do duodeno. A) Mecanismo natural de digestão de gordura. B) Mecanismo de ação do Orlistat na digestão de gordura.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o Microsoft Office 2020®.

A estrutura da lipstatina contém uma β -lactona, duas cadeias alquílicas C6 e C13 lineares em comprimento. A cadeia lateral C13 contém duas insaturações isoladas e um grupo hidroxil esterificado em *N*-formil leucina, sendo esta a única porção diferenciada em tetrahidrolipstatina (KUMAR *et al.*, 2012; HOCHULI *et al.*, 1987) (**Figura 2**). A β -lactona presente na estrutura da lipstatina está associada à atividade inibidora irreversível da lipase (WEIBEL EK *et al.*, 1987). A abertura da β -lactona resultou em perda quase total da atividade, sugerindo que esta é uma estrutura essencial para a inibição irreversível da lipase pancreática (STALDER *et al.*, 1992; BORGSTRÖM *et al.*, 1988). Experimentos em ratos demonstraram sua especificidade quando testados contra outras enzimas, fosfolipase e tripsina, onde não mostrou inibição de até 200 μ M de concentração (WEIBEL *et al.*, 1987; KUMAR *et al.*, 2015).

Figura 2 - Estrutura molecular de Orlistat e Lipstatina

FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17®.

Orlistat tem eficácia comprovada quando comercialiado a 120 mg e é administrado em combinação com uma dieta hipocalórica para diminuir o ganho de peso após o tratamento. Por mais de 20 anos, ele foi estudado sobre seus efeitos adversos, incluindo diarreia, fezes oleosas, dispepsia, dor abdominal, manchas fecais, esteatorrêia e efeitos tóxicos no fígado (KUMAR *et al.*, 2015; HARTMANN *et al.*, 1993). Outro efeito adverso da administração de orlistat é a absorção reduzida das vitaminas A, D, E e β -caroteno, devido a função da lipase de transportar proteínas lipossolúveis. Portanto, quando prescrito, a suplementação com multivitaminas é recomendada para a redução desses efeitos adversos (GLANDT *et al.*, 2011). Além disso, o orlistat fornece perda significativa de peso, manutenção e melhora do perfil lipídico. Também promove o controle dos níveis glicêmicos em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (HOLLANDER *et al.*, 1988; PADWAL *et al.*, 2007). Um dos fatores de risco para o diabetes *mellitus* tipo 2 é a obesidade, e a perda de peso está associada à redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, bem como ao melhor controle dos níveis glicêmicos (HOLLANDER PA *et al.*, 1998). Recentemente, a FDA e a EMA (Agência Europeia de Medicamentos) aprovaram orlistat de 60 mg (Alli®), que não requer receita médica, porém, com eficiência duvidosa (FDA, 2019; EMA, 2019; ANDERSON *et al.*, 2007; GLANDT *et al.*, 2011).

A retirada de medicamentos anti-obesidade pelas agências reguladoras tem sido atribuída aos seus efeitos adversos exasperantes, pertencentes principalmente a medicamentos que atuam no sistema nervoso central. Muitos medicamentos que atuam no SNC (Sistema Nervoso Central) foram retirados do mercado devido à sua cardiotoxicidade, além dos liberadores de neurotransmissores que causam à fadiga e dependência (HEALTH *et al.*, 2004).

Dessa forma, o mercado anti-obesidade criou uma tendência a expandir-se para uma variedade de inibidores da lipase pancreática que já existem como outras drogas em potencial em várias fases do desenvolvimento da droga. Assim, a via de inibição da lipase pancreática tornou-se um mercado em constante crescimento para medicamentos anti-obesidade em todo o mundo, onde as taxas de faturamento têm aumentado desde a sua aprovação pelo FDA. Em 2003, o Xenical[®] já era comercializado em 93 países e com 16 milhões de indivíduos tratados (ROCHE *et al.*, 2019). Na Inglaterra, de 1998 a 2005, houve um aumento de 36 vezes no número de prescrições.

Em 2005, as vendas do Orlistat atingiram US\$ 450 milhões em todo o mundo, com os Estados Unidos respondendo por 20% do consumo (BRAY *et al.*, 2007). A Roche informou que ganhou US \$ 197 milhões com as vendas do Xenical[®] no primeiro semestre de 2009 e, em julho, mais de 35 milhões de pessoas haviam comprado o medicamento (TAYLOR *et al.*, 2010). A GSK também informou que ganhou US \$ 125 milhões com as vendas do Alli[®] no segundo semestre de 2009 (RICHWINE L *et al.*, 2019). Já em 2011, o Alli[®] gerou uma receita de US \$ 154 milhões (HIRSCHLER B *et al.*, 2019).

Esta demanda aumentou a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos com efeitos adversos aceitáveis. Atualmente, o mercado aponta para um novo medicamento chamado cetilistat. O cetilistate inibe a lipase pancreática, com um valor de IC₅₀ de 5,95 nM. É a molécula concorrente mais próxima do mercado Orlistat. Inicialmente, a Alizyme[®] (Reino Unido) desenvolveu o Cetilistat, mas atualmente está sendo desenvolvido pela Takeda[®] (Japão) e Norgine[®] (Amsterdã) (YAMADA Y *et al.* 2008).

Em um ensaio clínico de fase II de 12 semanas, 612 pacientes diabéticos obesos com IMC de 28 a 45 kg/m² foram incluídos. Quando comparado com o placebo, o Cetilistat (120 mg e 80 mg) proporcionou perda de peso superior (4,32 kg e 3,85 kg) versus 2,86 kg de placebo. A perda de peso promovida pelo Orlistat (3,78 kg) foi semelhante à perda de peso promovida pelo Cetilistat. Nos grupos tratados com Orlistat e placebo, houve um número mais significativo de interrupções devido a efeitos adversos gastrointestinais (KOPELMAN P *et al.*, 2009). Os ensaios clínicos de fase III em pacientes obesos com diabetes *mellitus* 2 e dislipidemia resultaram na aprovação do Cetilistat em setembro de 2013 no Japão para a terapia de pacientes obesos com diabetes *mellitus* tipo 2 e dislipidemia (HAINER V *et al.*, 2014). O Cetilistat é comercializado como Oblean[®] 120 mg, porém ainda são necessários resultados experimentais para demonstrar sua eficácia no tratamento anti-obesidade (PMDA, 2019; NORGINE *et al.*, 2013)

2.5 Função e Estrutura de Lipases

2.5.1 Versatilidade estrutural e comportamento cinético

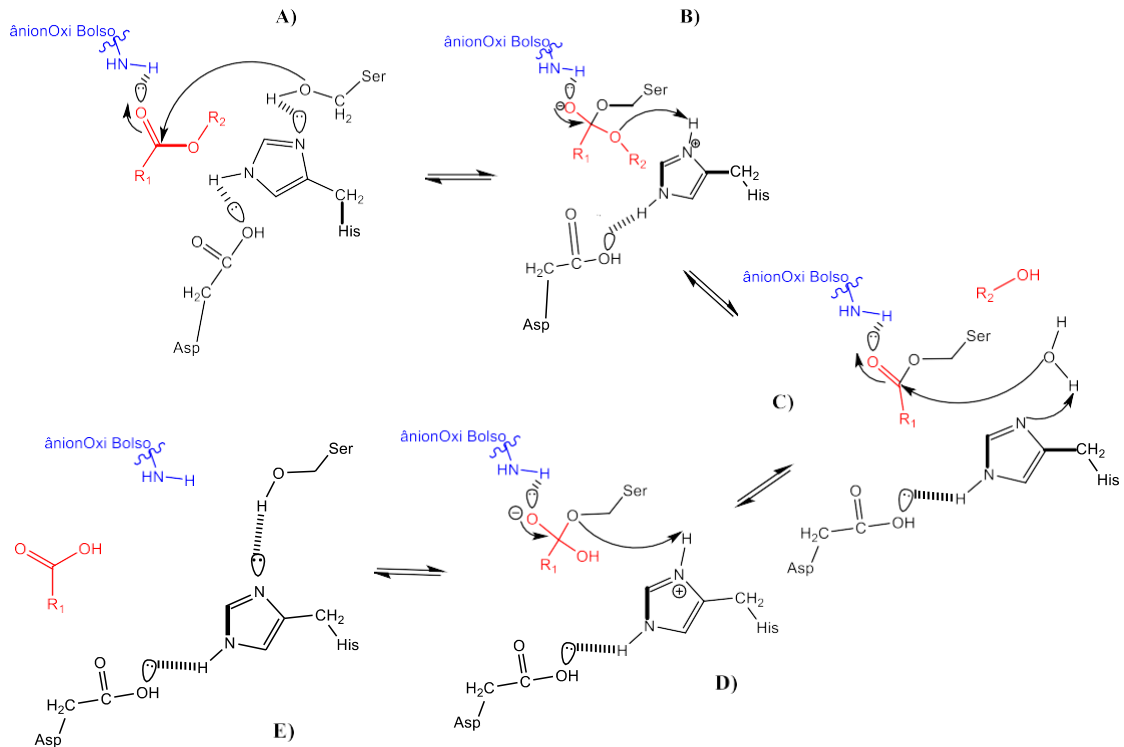
As lipases (E.C.3.1.1.3) estão presentes em quase todos organismos vivos (bactérias, leveduras, fungos, plantas, animais, etc.). Essas enzimas foram extensivamente estudadas em sua diversidade bioquímica e propriedades fisiológicas; revelando a função de hidrólise de TG, transporte de proteínas lipossolúveis e afinidade de catálise por uma gama de substratos com diferentes grupos ésteres carboxílicos (WHO *et al.*, 2019; WONG *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2006; O'DONOVAN G *et al.*, 2009).

O transporte de vitaminas lipossolúveis e a absorção da gordura pelos enterócitos intestinais fazem parte da função das lipases. O ambiente água-lipídeo são regiões de fácil interação das lipases com emulsões e substratos agregados de natureza anfipática (ALOWE *et al.*, 1994; PETERSEN *et al.*, 2001). A formação de ácidos graxos livres e monoacilglicerídeos pela hidrólise de triacilglicerídeos para absorção da gordura são possíveis devido a estrutura vesátil das lipases (ALOWE *et al.*, 1994).

Winkler et al (1990) revelaram por estruturas tridimensionais a ativação interfacial pela presença de uma alça anfipática que cobre a fenda do sítio catalítico, sugerido por Brzozowski *et al* (1991) como uma ativação pelo rearranjo conformacional da alça na interface lipídeo-água que torna o sítio ativo acessível ao substrato. A semelhança no padrão de dobramento das lipases, envolve um domínio *N*-terminal contendo a região do sítio ativo e o domínio *C*-terminal que contem a alça para a ativação interfacial realizada naturalmente pela colipase, um cofator fisiológico que controla o acesso à tríade catalítica (Ser153, Asp177 e His263) no sítio ativo (BELLE *et al.*, 2007; LOOKENE *et al.*, 1993).

A orientação superficial do acesso ao sítio ativo por substratos e/ou inibidores, é facilitado por matrizes estéricas dos resíduos de aminoácidos externos, usando um campo de força gerado pelo reconhecimento molecular que se estende de 10 a 15 Å. A disponibilidade do sítio ativo no *N*-terminal permite o acesso à tríade catalítica responsável pelo mecanismo de hidrólise dos triacilglicerídeos (BELLE *et al.*, 2007). A formação do complexo triacilglicerídeo-lipase (TG-lipase) forma um intermediário hemiacetal tetraédrico que permite a hidrólise da ligação éster e a liberação de diacilglicerídeo; a água presente reage com a serina acilada, expulsando o ácido graxo da fenda do sítio ativo (PETERSEN *et al.*, 2001) (**Figura 3**).

Figura 3 - Mecanismo de hidrólise de triacilglicerídeos catalisada por Lipase. A tríade catalítica representada em preto, resíduos do bolso oxiânion em azul e o substrato em vermelho. A) Ataque nucleofílico da hidroxila da serina no carbono carbonílico da ligação éster suscetível. B) Intermediário tetraédrico. C) Intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da água. D) Intermediário tetraédrico. E) Produto e enzima livre.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®] (Adaptado de RIBEIRO, 2011; MENESES, 2015)

A pesquisa por inibidores de lipase enfoca características estruturais anfipáticas que são grupos essenciais para interação na região C-terminal presente na interface lipídeo-água promovendo a abertura da alça (SRIDHAR *et al.*, 2017). Grupamentos ésteres nas moléculas são estratégias amplamente usadas para a ligação na região N-terminal através do resíduo serina no sítio ativo. Em geral, o desenho racional desses inibidores está relacionado preferencialmente a mimetização de substratos fisiológicos que são comumente moléculas anfipáticas (MAGRIOTI *et al.*, 2004; VU *et al.*, 2018).

2.5.2 Avanços no desenvolvimento de inibidores de lipase

2.5.2.1 Inibidores sintéticos e naturais

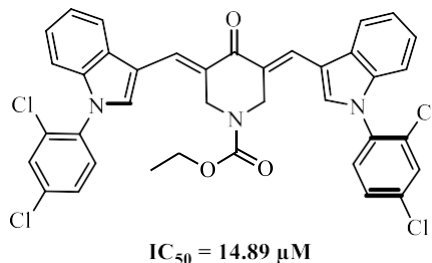
Os inibidores de lipase são encontrados em produtos naturais e sintéticos, uma grande parcela destes compostos bioativos apresenta séries miméticas de cofatores e substratos fisiológicos da lipase. São esperados que estes substituíntes sejam capazes de realizar principalmente interações hidrofóbicas com características anfipáticas para orientação ideal ao sítio de ativação interfacial localizado na região *C*-terminal, bem como através do mecanismo iniciador da hidrólise na serina presente no sítio catalítico.

Derivados indólicos

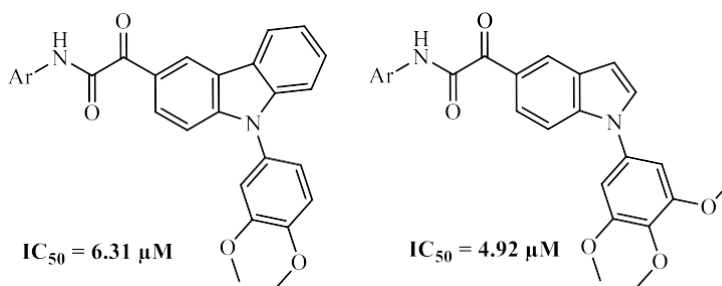
Buduma *et al.* (2016) (BUDUMA *et al.*, 2016) realizaram uma investigação sobre a atividade antiobesidade dos bisindóis sintéticos (**Figura 4. a**) inibindo a lipase do pâncreas suíno tipo II, encontrando IC_{50} de até 14,89 μ M. A substituição de grupos funcionais ligados a heterociclos também foi evidenciado por Sridar *et al* (2017) em carbazóis (**Figura 4. b**) representando uma classe importante de alcaloides indólicos. Foi identificado oxoacetoamidas ligadas ao carbazol com potencial atividade inibitória da lipase pancreática (pâncreas suíno tipo II). A mimetização de grupo ésteres por acetoamidas com grupos carbonil reativos, trabalha na hipótese de eletrófilos reativos no sítio ativo de interação com a serina responsável pela catálise. Neste estudo, a substituição do metoxifenil no carbazol apresentou alto potencial inibitório onde foi encontrado o grupo 3,4-dimetoxifenil com IC_{50} promissor de 6,31 μ M. Em 2019 (SRIDHAR *et al.*, 2019) o mesmo autor relatou atividade antilipase quando o grupo carbazol foi substituído por um núcleo indol. Os composto com substituínte 3,4,5-trimethoxyphenyl apresentou IC_{50} de 4,92 μ M.

Figura 4 - Derivados indólicos com atividade antilipase: a) Bisindol ; b) Carbazóis.

a) IC_{50} Orlistat = 62.25 μ M



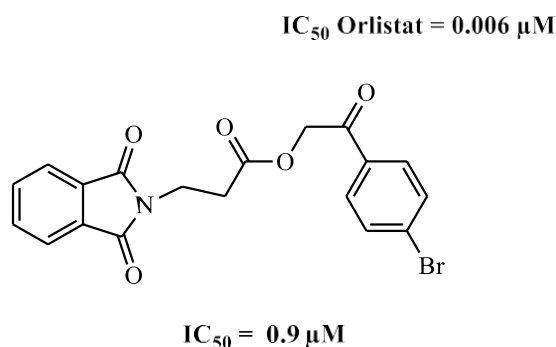
b) IC_{50} Orlistat = 0.99 μ M



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®]

Ésteres

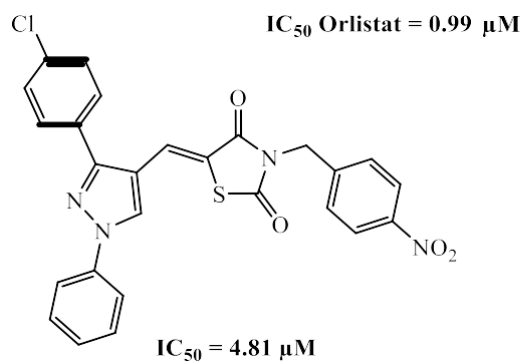
Em 2018, Sankar e colaboradores (SANKAR *et al.*, 2018) mostraram uma série de potentes ésteres fenacílicos inibidores da LP. Todos os compostos testados apresentaram bons resultados de inibição com valores de IC_{50} variando de 1 a 3 μ M. O composto exibiu o potencial máximo de inibição desta série substituída pelo grupo bromo, apresentou IC_{50} de 0,9 μ M (**Figura 5**). O estudo sugere uma estrutura farmacofórica de ésteres fenacílicos com potencial promissor para inibição na região do sítio catalítico

Figura 5 - Éster fenacílico com atividade antilipase

FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Derivados tiazólicos

Tiazolidinonas apresentaram atividade antilipase pancreática. Sridar e colaboradores (2017) apresentaram uma série *p*-nitrobenzila com alto potencial de inibição com valores de IC_{50} menor que 10 μ M. O composto com substituinte *para*-cloro no anel aromático apresentou IC_{50} de 4,81, sendo considerado o inibidor mais potente desta série. Além disso, estudos de *docking* molecular confirmaram a sobreposição com orlistat no mesmo sítio de ligação apresentando semelhança de rotação do farmacóforo e proximidade do aminoácido Ser152 no sítio catalítico (**Figura 6**).

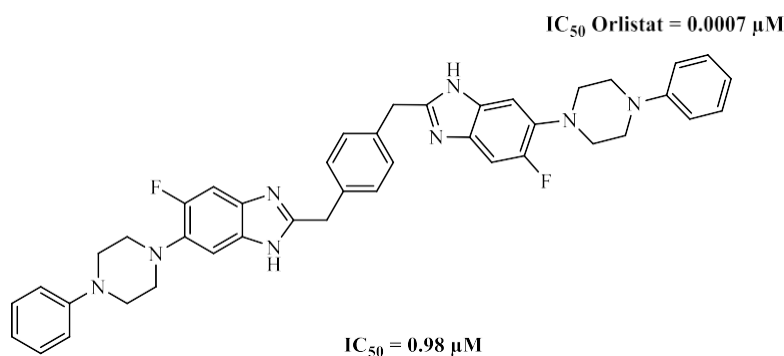
Figura 6 -Tiazolidinona com atividade antilipase

FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Derivados imidazólicos

Compostos derivados do benzimidazol, inibidores da síntese de RNA viral, mostraram forte atividade inibidora da LP com valores de IC_{50} de 1 a 6 μM . O composto com substituintes flúor e piperazina, é o composto mais ativo da série, mostrando um valor de IC_{50} de 0,98 μM (**Figura 7**). Os estudos *in silico* indicaram a afinidade para a mesma região do substrato fisiológico, embora não seja mais eficiente em comparação com Orlistat, a previsão das propriedades de ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação) mostrou propriedades farmacêuticas na faixa de 95%, podendo ser usada para consumo humano (MENTEŞE *et al.*, 2017).

Figura 7 - Benzimidazol com atividade antilipase.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Compostos fenólicos

Estes compostos foram encontrados com efeitos inibitórios frente a LP, principalmente encontradas a partir de fontes naturais tais como sementes, folhas, frutos, cascas, caules, etc. Deste modo, os extratos com potencial antilipase apresentaram satisfatório resultado dose-resposta, sendo otimizados com o isolamento do composto fenólico, a literatura relata moléculas como ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido quercetina, ácido quínico, ácido catequínico, estilbenos e broussononas, apresentando candidatos no desenvolvimento de inibidores de lipase.

Ácido clorogênico (ACG)

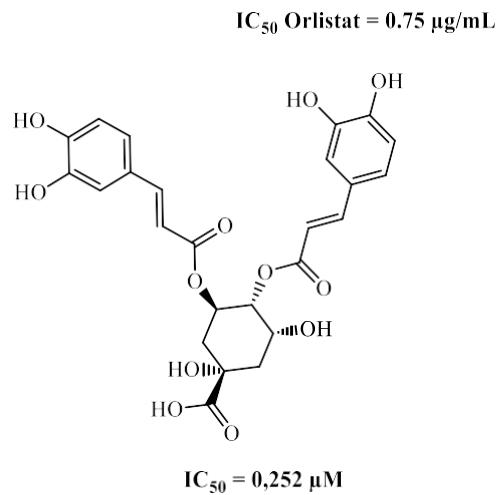
ACG e seus isômeros foram relatados por Karar e colaboradores (KARAR, 2016; CAO, 2020) com propriedades biológicas antioxidantes, bactericidas, anti-inflamatórios, além de ser

eficaz na preservação de certos tipos de alimento como frango congelado e pêssego (SUN et al.; 2020; JIAO et al.; 2019, CAO et al.; 2020). Recentemente, ACG mostrou boa eficiência na inibição da lipoxigenase, enzima responsável pela oxidação de lipídeo, porém o mecanismo de ação ainda não está elucidado (CAO *et al.*, 2019). Recentemente, Cao e colaboradores (CAO *et al.*, 2020) analisaram a atividade inibitória da lipase endógena e da lipoxigenase em carne de peixes, afim de compreender o mecanismo e as interações envolvidas na inibição. O resultados apontaram inibição crescente com a adição de ACG, apresentando valores de IC_{50} de 0,58 mg/mL para lipase e 0,32 mg/mL para lipoxigenase. Os estudos cinéticos caracterizaram o tipo de inibição reversível para lipase, enquanto que o gráfico duplo recíproco (Lineweaver-Burk) apresentou feição de um grupo de linhas retas intersectando o ponto de origem Y, sendo determinado pelos parâmetros da constante de Michaelis-Mentem (K_M) com valores crescentes e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) com valores constante, desta forma, indicando que CGA e o substrato *in vitro* competem pela ligação ao sítio catalítico (CAO *et al.*, 2020).

Ácido Cafeico

Outros compostos polifenólicos similares apresentando atividade antilipase, são encontrados no café e caracterizadas pela presença do éster cafeico e do ácido quínico. As características bioativas desta classe de compostos foram atribuídas à inibição da atividade da lipase pancreática pelo ácido cafeoilquinínico e seus isômeros, dentre eles isômeros de ACG. Hu *et al* (2015) analisou compostos fenólicos extraídos do café, encontrando atividade promissora em seis ácidos cafeoilquinínico com destaque para um isômero de CGA. O ácido isoclorogênico apresentou maior potencial dentre os ácidos testados com IC_{50} de 0,252 μM , enquanto a feição do gráfico cinético Lineweaver-Burk mostrou intersecção das retas em um único ponto em Y, juntamente com dos dados de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ que caracterizaram comportamento competitivo para os seis compostos, sendo validado também pelo estudo *in silico* que formou complexo com o sítio ativo próximo a Ser153, local da atividade catalítica (**Figura 8**).

Figura 8 - Ácido Isoclorogênico com atividade antilipase.

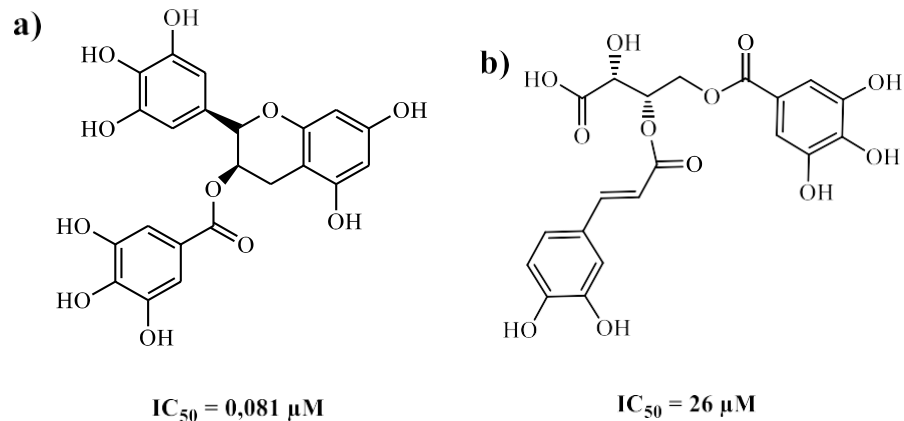


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Catequina e Quercetina

O isolamento de compostos derivados de produtos naturais com atividade antilipase tem se destacado também em catequinas e quercetinas. Yuda *et al* (2012) relatou atividade inibitória *in vitro* de extratos provenientes dos resíduos das folhas de chá preto (*Camellia sinensis*). O isolamento dos compostos apontou uma estrutura derivada da catequina com alto destaque dentre as moléculas presente no extrato de *C. sinensis*, a estrutura promissora chamada (-) galato de epigalocatequina apresentou IC_{50} de 0,081 μ M frente à LP (**Figura 9. a**). (YUDA *et al.*, 2012). Por outro lado, estruturas análogas como as quercetinas também apresentam afinidade pelo ambiente fisiológico e pela estrutura das lipases. Uma planta oriental de nome científico *Filipendula kamtschatica* já utilizada culturalmente para o tratamento de eczema, urticária e diarreia, foi encontrado potencial de inibição de 95% da atividade da lipase em concentração de 2,5 mg/mL. Posteriormente, experimentos com o extrato hidroalcolico de *F. Kamtschatica*, foi possível isolar um composto derivado da quercetina apresentando o maior destaque na ação antilipase dentre os compostos. O ácido isolado (*O*-cafeoil-4-*O*-galoil-*L*-treônico) apresentou valor de IC_{50} de 26 μ M frente à LP (**Figura 9. b**).

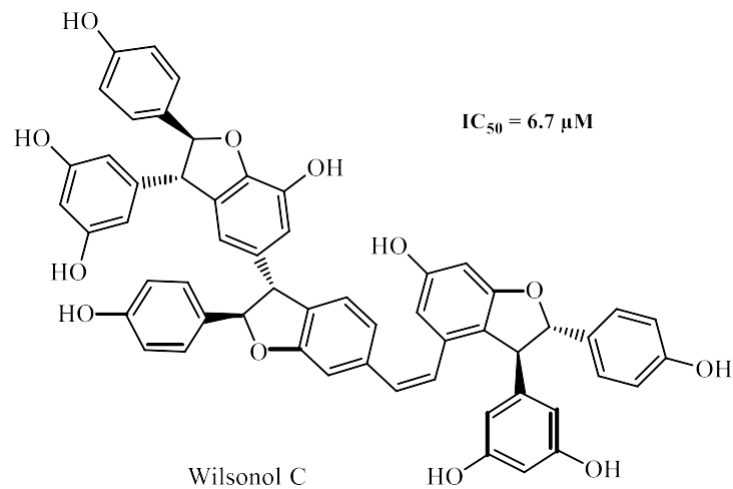
Figura 9 - Compostos polifenólicos derivados da catequina a) e quercetina b) com atividade antilipase.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

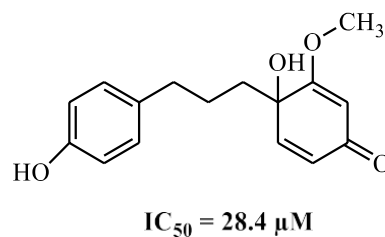
Estilbenos

Outra fonte de polifenol também encontrado no cultivo de uvas para a produção de vinho, sucos e frutas, são provenientes da família de videiras *Vitaceae* de aproximadamente 60 espécies. Estas videiras são distribuídas na América do Norte, Ásia e Europa, apresentando forte potencial antioxidante (ROSSETO, 2002; SEFC, 2003; CRESPLAN, 2004; THIS, 2004). Uma das espécies desta família chamada *Vitis vinifera*, são ricos em polifenóis e contém os metabólitos secundários derivados de estilbenos que são uma classe de compostos contendo unidades resveratrol polimerizadas. A base da estrutura de estilbenos é formada por duas porções fenil ligadas por uma ponte de etileno a uma terceira porção fenil. Estas estruturas já foram relatadas com efeitos biológicos anticâncer, antibacteriano, anti-inflamatório e antiobesidade (PENG, 2008). Contudo, nas análises de mensuração da atividade catalítica de lipases, foi encontrado potencial de inibição a partir do extrato aquoso da raiz de *V. Vinifera*. O composto isolado de maior destaque (Wilsonol C) apresentou IC_{50} de 6,7 μM para o alvo da LP no tratamento da obesidade (KIM, 2013) (**Figura 10**).

Figura 10 - Estilbenos com atividade antilipase

FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Alguns compostos fenólicos encontrados na medicina popular chinesa apresentaram indícios de atividade inibitória para LP. O extrato da casca do caule de *Broussonetia kanzinoki* já popularmente conhecido como tônico, diurético e supressor de edema, foi revelado por Hoon e colaboradores (2012) com atividade antilipase. O isolamento dos componentes do extrato indicou uma Broussonona com maior potencial dentre as outras frações, apresentou IC_{50} de 28,4 μM frente à LP (HOON *et al.*, 2012) (**Figura 11**).

Figura 11 - Broussonona com atividade antilipase

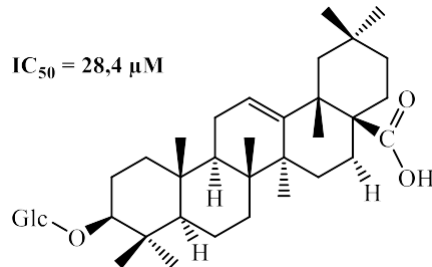
FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Saponinas

A classe das Saponinas é composta de um açúcar ligado a um triterpeno ou esteroide caracterizando em alguns casos atividade biológica frente a lipase. Compostos extraídos de *Acanthopanax senticosus*, um arbusto encontrado no nordeste da Ásia utilizado na medicina tradicional chinesa para tratar hipertensão, artrite, tumores, cardiopatia isquêmica e neurastenia. Após o fracionamento do extrato etanólico do fruto de *A. senticosus*, foi possível verificar inibição da lipase pancreática, seguindo com o isolamento de uma molécula apresentando valor

de IC_{50} de $0,22\mu M$. Esta ação antilipase é correspondente a estrutura copterosídeo B (**Figura 12**) uma saponina com substituínte glucosídico sendo a mais promissora dentre as saponinas presentes na fração etalólica (LI *et al.*, 2007).

Figura 12 - Saponina com atividade antilipase

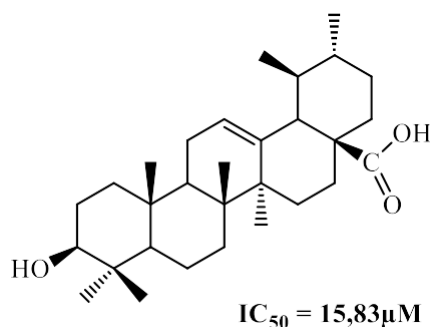


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Terpenos

Os terpenos são uma classe de compostos com ramificações de 5 carbonos, semelhantes ao isopreno. Um tipo de kiwi encontrado no Japão, norte da China, Coréia e Sibéria, chamado *Actinidia arguta* tem sido utilizado na Coréia para tratamento da obesidade (FERGUSON, 1991; KIM, 1995; WEBBY, 1990). Embora o seu mecanismo de ação não esteja elucidado, foi possível isolar triterpenos bioativos com atividade inibidora da lipase pancreática a partir das raízes de *A. arguta*, as análises mostraram *in vitro* o ácido ursolínico com IC_{50} de $15,83 \mu M$ frente à lipase, sendo o melhor candidato dentre os terpenos isolados (JANGS, 2008) (**Figura 13**).

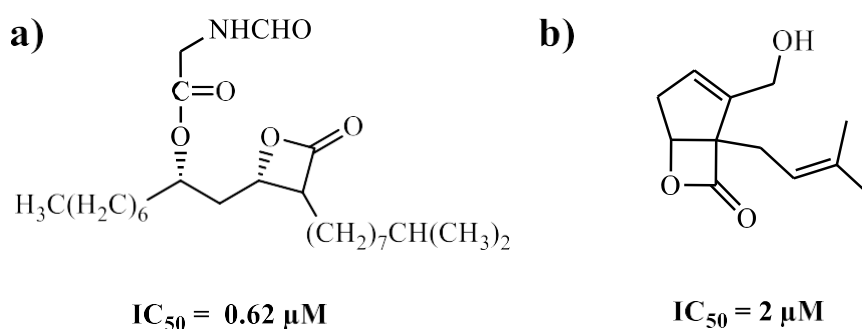
Figura 13 - Terpeno com atividade antilipase.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17®.

Dois fontes microbiais com origens diferentes apresentaram atividade inibitória frente a lipase pancreática. Foi possível isolar um grupo de panciclina da bactéria *Streptomyces sp.* (NR 0619). Uma das estruturas, chamada de panciclina C, possui estruturalmente uma β -lactona (farmacóforo comum em orlistat), duas cadeias alquil e um substituinte *N*-formilgliciloxi, apresentando alto potencial antilipase pancreática de IC_{50} 0,62 μM (MUTOH, 1994) (**Figura 14. a**). Em outro estudo com o fungo *Basidiomycete stereum complicatum* (ST 001837), foram isoladas pericquininas com potencial promissor de IC_{50} de 2 μM para LP (HOPMANN, 2003) (**Figura 14. b**).

Figura 14 - Bactéria e fungo com atividade antilipase. a) Pentaciclina derivado da bactéria *Streptomyces sp.* b) pericquininas derivado do fungo *Basidiomycete stereum complicatum*



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17®.

Em geral, as estruturas apresentadas estão sendo estudadas em etapas iniciais para a descoberta de um novo candidato, salientando a importância do desenvolvimento de novos arcabouços com resultados significantes nos estudos *in vitro* e progredindo para etapas seguintes no desenvolvimento do fármaco. Assim, dentro desta problemática, o presente trabalho surgiu

a partir de resultados promissores de estudos com arcabouço de AGH frente a liapse de *C. rugosa* no âmbito biotecnológico (**item 5.1**). Devido a facilidade de obtenção dos compostos AGH, também foi feito estudos com TSC através da técnica de bioisosterismo clássico para a obtenção de mais protótipos. Esta tese apresenta arcabouços inéditos para estudos com lipase, além da perspectiva inovadora da aplicação como medicamento antiobesidade, afim de contribuir com o banco de dados de compostos ativos para o tratamento da obesidade.

2.6 Derivados de AGH e TSC: Obtenção e Aplicações

2.6.1 Obtenção e bioisosterismo clássico

O procedimento geral para síntese guanilhidrazonas são comumente obtidas através de uma condensação em meio alcoólico do grupo guanil com aldeídos ou cetonas, em refluxo com quantidade catalítica de ácido (MESSERER *et al.*, 1995; ULRICH *et al.*, 1984). Da mesma forma, o procedimento para obtenção de TSC, produzido através da reação direta entre aldeídos ou cetonas com tiossemicarbazida sob refluxo em meio alcoólico e ácido catalítico (HANG *et al.*, 2001; TENÓRIO *et al.*, 2005). Em geral, as duas classes de moléculas apresentam vantagem na versatilidade para aplicação de intermediários importantes para atividade biológica, além disso, o processo corresponde a um baixo custo de insumos para síntese e economia de átomos, pois todos os reagentes estão presentes no produto final com exceção da água liberada durante a reação (EPIFÂNIO *et al.*, 2011; TENÓRIO *et al.*, 2005).

A pesquisa em Química Medicinal com as classes AGH e TSC está fundamentada no conceito de bioisosterismo, utilizado como estratégia para descoberta de novos protótipos de fármacos. O bioisosterismo foi desenvolvido a partir do princípio de isosterismo por Langmuir, sendo aplicado no interesse de analisar o comportamento químico e a reatividade de compostos contendo átomos com o mesmo número de elétrons de valência (isoeletrônicos). Esta técnica busca melhorar a eficácia terapêutica, segurança e formulação aceitável para uso clínico, além da redução de efeitos adversos (BARREIRO, *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2005). Portanto, a contribuição sobre a atividade biológica de AGH pode ser reavaliada pela modificação no grupo NH, sendo substituído por enxofre (TSC), pois o número de valência permanece para ambos os átomos, desta forma, a influência do bioisostero pode ser mais ativo, apresentar a mesma atividade ou ser antagonico, devido a diversos fatores estruturais, conformacionais, energéticos e eletrônicos.

2.6.2 Aplicações terapêuticas e biotecnológicas

Diversas AGHs vem sendo estudadas por suas propriedades farmacológicas, a função guanidina está relatada notavelmente com atividades anticâncer, anti-hipertensivo (FOYE *et al.*, 1990; HOFFMAN *et al.*, 2003), antidiabéticos (LARSEN *et al.*, 2001; EDMONT *et al.*, 2000), antineoplásicos (ANDREANI *et al.*, 2000; BRZOZOWSKI *et al.*, 2007), antibacterianos (WALZER *et al.*, 1994; GADAD *et al.*, 2000; BORGES *et al.*; 2001), antimaláricos (RUIZ *et al.*; 1970) e tripanocida (SUNDBERG *et al.*, 1990; MESSEDER *et al.*, 1995). Por outro lado, as TSCs são relatadas como agentes antitumorais (FEUN *et al.*, 2002) antimalárica (KLAYMAN *et al.*, 1984), anti-HIV (CASAS *et al.*, 1998; TEITZ *et al.*, 1994) antibacteriana (KASUGA *et al.*, 2003), antiprotozoária (BHARTI *et al.*, 2002) e citotóxica (LI *et al.*, 1998).

Estudos farmacológicos com derivados de AGH (ácido 3-guanidinopropiônico) demonstraram uma redução da hiperglicemia em ratos obesos e diabéticos bem como perda de peso nos animais (VAILLANCOURT *et al.*, 2001). Está relatado que AGHs lipofílicas ou hidrofílicas, ambas têm potencial para o tratamento de diabetes com eficácia das reduções da glicose sérica e melhoras na ação da insulina endógena (LARSEN *et al.*, 2001). No entanto, os estudos relacionando AGH ao tratamento de diabetes em animais obesos, não comprovam a ação de AGH diretamente ao tratamento da obesidade, apesar das melhorias evidentes vinculadas a diabetes como comorbidade gerada pela obesidade.

Por outro lado, em âmbito biotecnológico, as AGHs foram avaliadas em ensaios de atividade da lipase no intestino de larvas *Rhynchophorus palmarum*, besouro encontrado nas plantações e lavouras como praga agrícola. O perfil de inibição na lipase do inseto, apresentou inibição satisfatória de até 79% da atividade catalítica, afetando o metabolismo do inseto e agindo como inseticida no controle de pragas (SANTANA *et al.*, 2019).

Por fim, através destas perspectivas, este trabalho foi desenvolvido com base na literatura de AGHs como importante arcabouço molecular com potencial farmacológico comprovado. Em suma, a aplicação biotecnológica desta classe de moléculas mostrou potencial atividade frente à lipase, sendo assim, o estado da arte desenvolvido nesta fundamentação teórica apresenta uma aplicação inédita para a classe das guanidinas, levando a contribuir para os estudos de tratamento da obesidade através da via de inibição da lipase pancreática, buscando apresentar novas opções de potenciais fármacos seguros e eficazes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Propor novas estruturas de compostos potencialmente ativos frente à lipase, afim de propor estruturas químicas inéditas baseadas no arcabouço de AGH e TSC, contribuindo para o banco de dados de candidatos a fármaco no tratamento da obesidade.

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Mensurar a atividade antilipase de AGH e TSC.
- ❖ Determinar o valor de IC_{50} das estruturas mais promissoras.
- ❖ Determinar K_M e $V_{m\acute{a}x}$ do melhor candidato.
- ❖ Propor novas estruturas a partir do melhor candidato.
- ❖ Analisar através de *screening* virtual todas as estruturas de AGH e TSC presentes na quimiotéca, incluindo as estruturas inéditas propostas a partir melhor candidato.
- ❖ Validar o tipo de lipase como modelo enzimático para análise de *docking* molecular.
- ❖ *Screening* virtual de AGH, TSC e derivados inéditos do melhor candidato, frente à lipase validada.
- ❖ *Docking* molecular do sítio de ligação da estrutura com maior pontuação de encaixe medido pelo *screening* virtual.
- ❖ Indicar o melhor candidato com base nos estudos realizados.

4 MATERIAIS E METÓDOS

4.1 Reagentes e Soluções

Metanol anidro 99,8% (Sigma Aldrich [®])	Tris-HCl 50mM (2,5% Triton X-100) pH 8,0
Água Deionizada	Solução de <i>C.rugosa</i> Lipase 1U/mg
Água Destilada	Gás Argônio
Metilumbeliferil (MUF) butirato (Sigma Aldrich [®])	Aminoguanidinas *
	Tiosemicarbazonas *

*Inibidores analisados nos ensaios *in vitro* estão representados no tópico Resultados e Discussões.

4.2 Materiais e Equipamentos

Vidrarias volumétricas	Placas de agitação e aquecimento
Capela com exaustor	FlexStation 3 Benchtop Multi-Mode
Balança analítica	Microplate Reader
Estufa	Microplaca
Freezer	Pipeta automática

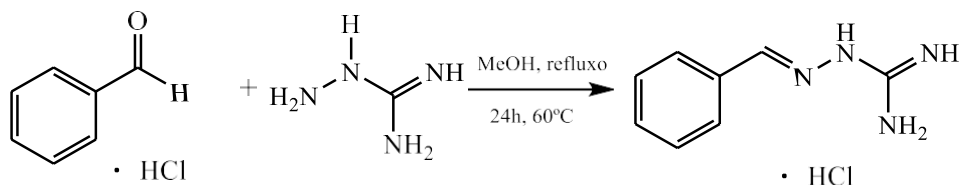
4.3 Procedimentos Reacionais

4.3.1 Método de obtenção dos derivados de (*E*)-2-benzilideno-hidrazina carboximidamida (AGH)

As guanilhidrazonas aromáticas foram preparadas utilizando-se a metodologia descrita por Ulrich e Cerami (1984) aplicando a reação de condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com aminoguanidinas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (ULRICH *et al.*, 1984). A partir da condensação do cloridrato de aminoguanidina (1 mmol) com os respectivos benzaldeídos substituídos (1,1 mmol) (**Figura 15**), solubilizados em 5 mL de metanol a 85 C° por 24 horas em refluxo. Após formação do produto, a mistura reacional foi evaporada, o sólido obtido foi triturado com acetato de etila e filtrado. A reação acompanhada por placas CCD onde observou-se o desaparecimento total ou

parcial dos produtos de partida. Após a reação foram obtidos guanilhidrazonas na forma de cloridrato como produtos cristalinos com o resfriamento à temperatura ambiente.

Figura 15 - Síntese de obtenção dos compostos AGH

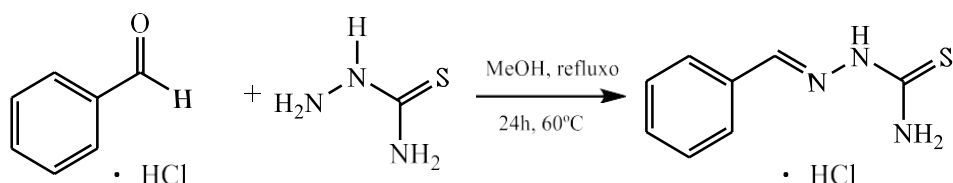


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw Ultra 12.0®.

4.3.2 Método de obtenção dos derivados de (*E*)-2-benzilideno-hidrazina carbotioamida (TSC)

As tiossemicarbazonas aromáticas foram preparadas pela metodologia de reação direta dos respectivos aldeídos com tiossemicarbazida em refluxo de metanol 95% descrevendo a condensação equimolar de um derivado carbonilado, sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (TENÓRIO *et al.*, 2005). A partir da condensação da tiossemicarbazida (1 mmol) com os respectivos benzaldeídos substituídos (1,1 mmol) (**Figura 16**), solubilizados em 5 mL de metanol a 85 C° por 24 horas em refluxo. Após formação do produto, a mistura reacional foi evaporada. A reação acompanhada por placas CCD onde observou-se o desaparecimento total ou parcial dos produtos de partida. Após a reação foram obtidos tiossemicarbazonas como produtos no estado sólido.

Figura 16 - Síntese de obtenção dos compostos TSC.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw Ultra 12.0®.

4.3.3 Avaliação Biológica dos Inibidores frente à Lipase *Candida rugosa*

4.3.3.1 Ensaios Fluorimétricos de Atividade Enzimática com MUF-Butirato

Os ensaios fluorimétricos foram determinados segundo o protocolo com MUF-Butirato. No preparo da solução de MUF-Butirato, pesou-se 6 mg de MUF-Butirato e dissolveu-se em 1 mL de etilenoglicol metil éster, o substrato preparado foi diluído em 40 mL de Tris-HCl 50 mM (2,5% Triton X-100) pH 8,0, obtendo uma concentração final de 100 µmol/L. A atividade enzimática controle foi mensurada em microplaca com poço de 200 µL, sendo adicionado: 30 µL de solução de *C. rugosa* Lipase 1 U/mg, 20 µL de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e 150 µL solução MUF-Butirato. Após a adição da solução *C. rugosa* Lipase 1 U/mL, tampão Tris-HCl e o substrato MUF-Butirato, foi incubado por 30 minutos. Todas as leituras fluorimétrica foram realizadas em quadruplicata à temperatura ambiente com comprimento de onda de emissão de 450 nm e excitação de 340 nm.

4.3.3.2 Ensaios Fluorimétricos de Inibição Enzimática com MUF-Butirato

A inibição enzimática foi determinada segundo o mesmo protocolo do **item 4.3.3.1**, adaptando a adição do agente inibidor (aminoguanidina/tiosemicarbazona) de lipase. Foi adicionado em poço de 200 µL: 30 µL de solução de *C. rugosa* Lipase 1 U/mg, 20 µL do agente inibidor e 150 µL solução MUF-Butirato. Após a adição da solução *C. rugosa* Lipase 1 U/mg e do agente inibidor, foi incubado por 10 minutos e em seguida adicionado ao mesmo poço o substrato MUF-Butirato, desta vez incubando por 30 minutos. A leitura foi realizada sobre as mesmas condições de replicata, temperatura e comprimentos de onda.

4.3.3.3 Ensaios Fluorimétricos de Inibição Enzimática para Determinação das Curvas Dose-Resposta: IC_{50} , $V_{máx}$ e K_M .

Os métodos de triagem com os agentes inibidores foram realizados em concentração fixa de 50 μ M e 20 μ M. Enquanto a determinação da curva dose-resposta de 50% da atividade inibitória máxima foi realizada sobre a faixa de concentração de agente inibidor de 1 μ M à 100 μ M. Para determinação dos parâmetros $V_{máx}$ e K_M , variou-se a concentração de substrato MUF-Butirato de 50 à 200 μ M sobre a concentração fixa do agente inibidor em análises subsequentes de 1 μ M à 7 μ M, gerando os valores dos parâmetros através da curva cinética de Lineweaver-Burk, sendo determinado as características da natureza de inibição.

4.3.4 Modelagem *in silico*

4.3.4.1 Detalhes Computacionais

Todos os experimentos envolvendo *docking* molecular foram realizados em um notebook ACER® modelo Aspire E5-573G, com processador Intel® Core™ i-5-5200U, CPU 2,2 GHz, memória RAM de 8 GB e plataforma Windows® 10.

4.3.4.2 Validação da Lipase em Modelo Cristalográfico

A análise computacional iniciou-se a partir do método de validação do modelo enzimático. Os arquivos contendo as estruturas tridimensionais cristalográficas das lipases de código 1LPN, 1CRL, TRH e 1GZ7 obtidas no *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank - RCSB PDB*. Os modelos enzimáticos foram validados pelos algoritmos *Chemical Piecewise Linear Potential (CHEMPLP)*, *GoldScore*, *ChemScore* e *Astex Statistical Potential (ASP)*.

4.3.4.3 *Docking* molecular

As estruturas moleculares das AGH e TSC foram desenhadas em *software* Chemdraw 3D 12.0. Os *dockings* moleculares para o cálculo energético de encaixe foram realizados sobre a enzima de código 1CRL (PDB) referente a lipase *C. rugosa* (obtido no *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank - RCSB PDB*) (<https://www.rcsb.org/structure/1CRL>) e analisados pelo algoritmo CHEMPLP. As moléculas

cocristalizadas à estrutura do modelo enzimático validado foram removidas, incluindo as moléculas de água e íons. Adicionalmente, permitiu-se que todos os átomos aceptores e doadores de interação de hidrogênio fossem tratados como acessíveis ao solvente e os inibidores foram admitidos como capazes de detectar cavidades. Os valores de pontuação encaixe foram feitas pelo *software* GOLD[®] v. 5.8.1 (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>) empregado em todas as simulações, sendo determinada com o valor do coeficiente de correlação (r^2) e as contribuições energéticas das interações (interações de hidrogênio e hidrofóbicas/Van der Waals).

O *docking* molecular para visualização dos compostos LQM 17 e GOL 19 sobre a enzima de código 1CRL, as estruturas dos compostos foram inicialmente convertidas em estruturas tridimensionais, em seguida minimizados energeticamente através da aplicação do método semi-empírico *Austin Model 1* (AM1) utilizando-se o *software* ARGUSLAB[®] v. 4.0.1 (<http://www.arguslab.com>) (THOMPSON et al.; 2004). Para o pré-tratamento da lipase 1CRL e execução dos *dockings*, o *software* GOLD[®] v. 5.4.0 foi empregado durante as simulações. A função de pontuação encaixe foi calculado da mesma forma anteriormente apresentada pelo *software* GOLD[®] v. 5.8.1. Por fim, foram selecionadas as melhores visualizações do sítio de ligação e os respectivos resíduos de aminoácidos envolvidos na formação do complexo LQM 17-1CRL e GOL19-1CRL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Fundamentação Prática e Teórica

Este trabalho surgiu da minuciosa observação de resultados prévios de pesquisas no âmbito biotecnológico e suportado por bases teóricas compiladas da literatura. Resultados apresentados por Santana *et al* (2019) em estudos de metabolismo e nutrição de insetos da praga do coqueiro, foi possível constatar o poder de inibição de aminoguanidinas como potencial inibidor da lipase intestinal dos insetos como controle de praga, fato este que despertou o estado da arte para a criação desta tese, sendo conduzido ao estudo e desenvolvimento de inibidores de lipase para o precário mercado de medicamentos contra a obesidade. Considerada a doença da modernidade, atualmente a via de inibição da lipase pancreática está em grande destaque entre os medicamentos aprovados pelos órgãos competentes com efeitos adversos toleráveis. A literatura apresenta um limitado acervo de moléculas potencialmente ativas que estão em fase de testes iniciais, principalmente de origem sintética e de baixo custo como o caso das aminoguanidinas.

A base teórica gerada por este trabalho foi publicada por um livro internacional. A reunião de artigos recentes publicados por autores diversos permitiu a execução da primeira parte da fundamentação teórica desta tese de doutorado. Foi possível contribuir para o meio científico no formato de capítulo de livro internacional, intitulado *Antiobesity Drugs Against Fat Absorption: Current Status and Future Prospects of Lipase Inhibitors - Chapter 1* publicado em 2019 na primeira edição do livro *Advances in Medicinal Chemistry Research* (LEONCINI *et al.*, 2019). Neste, foi possível apresentar recentes avanços no desenvolvimento de compostos ativos inibidores de lipase de fontes sintéticas e naturais, organizando um banco de dados de estruturas promissoras com a proposta de diminuir a carência do mercado de medicamentos seguros e eficazes no tratamento da obesidade.

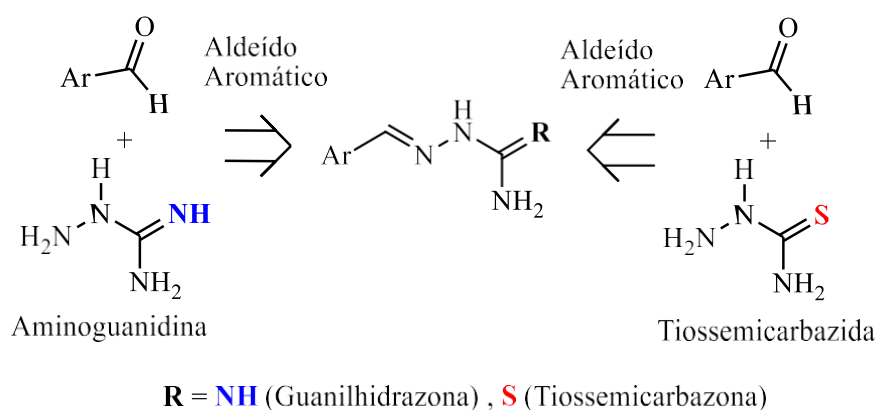
5.2 Banco de Moléculas (quimiotéca) e Síntese dos Potenciais Inibidores de Lipase.

De modo geral, todos os compostos sintetizados foram obtidos a partir de projetos anteriores do laboratório com outras finalidades e aplicações, deste modo estas moléculas fazem parte da quimiotéca do Laboratório de Química Medicinal (LQM) com rendimentos e grau de pureza satisfatórios, caracterização química estrutural por espectroscopia e/ou espectrometria, além do mecanismo reacional descrito em detalhes.

5.2.1 Síntese dos Derivados de Guanilhidrazonas

A síntese e a avaliação farmacológica de derivados amidínicos conduziu trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa para o planejamento e a síntese de AGH e TSC (JÚNIOR *et al.*, 2006, JÚNIOR *et al.*, 2007; BENDERITTER *et al.*, 2007). Nesta época, foram planejadas a obtenção das moléculas com base em duas regiões de substituição, utilizando o esqueleto estrutural de AGH e TSC aromáticas. Sinteticamente são necessários quantidades equimolares de aldeídos aromáticos e cloridrato de aminoguanidina ou tiossemicarbazida, para obtenção de AGH e TSC, respectivamente. As estruturas com diferentes regiões aromáticas foram obtidas a partir de diferentes aldeídos aromáticos, enquanto que modificações na região R propõe uma diversidade de grupos químicos com implicações biológicas (**Figura 17**).

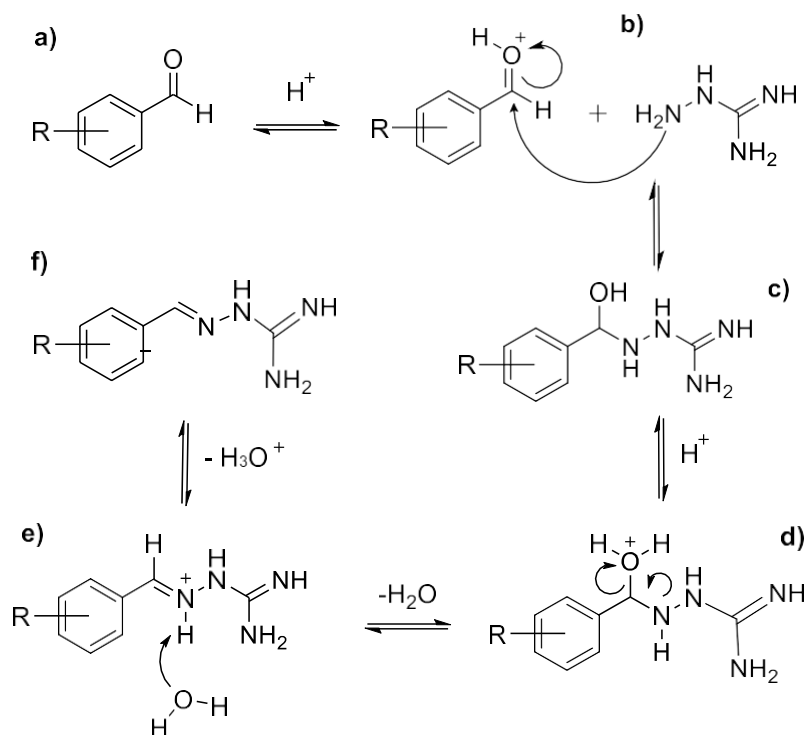
Figura 17 - Formação da estrutura base das guanilhidrazonas e tiossemicarbazonas



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17® (Adaptado de EPIFÂNIO, 2011)

O mecanismo reacional inicia-se com a protonação do grupo carbonila (*a*) seguido da adição de aminoguanidina ao grupo carbonila através do ataque nucleofílico (*b*). Após a protonação da hidroxila formando água (*c*), ocorre a formação do íon imínio através da liberação da água como grupo abandonador (*d*), a desprotonação do íon imínio (*e*), finaliza o mecanismo para a formação de AGH (*f*) (**Figura 18 (a)-(f)**).

Figura 18 - Mecanismo proposto para a síntese de AGH.



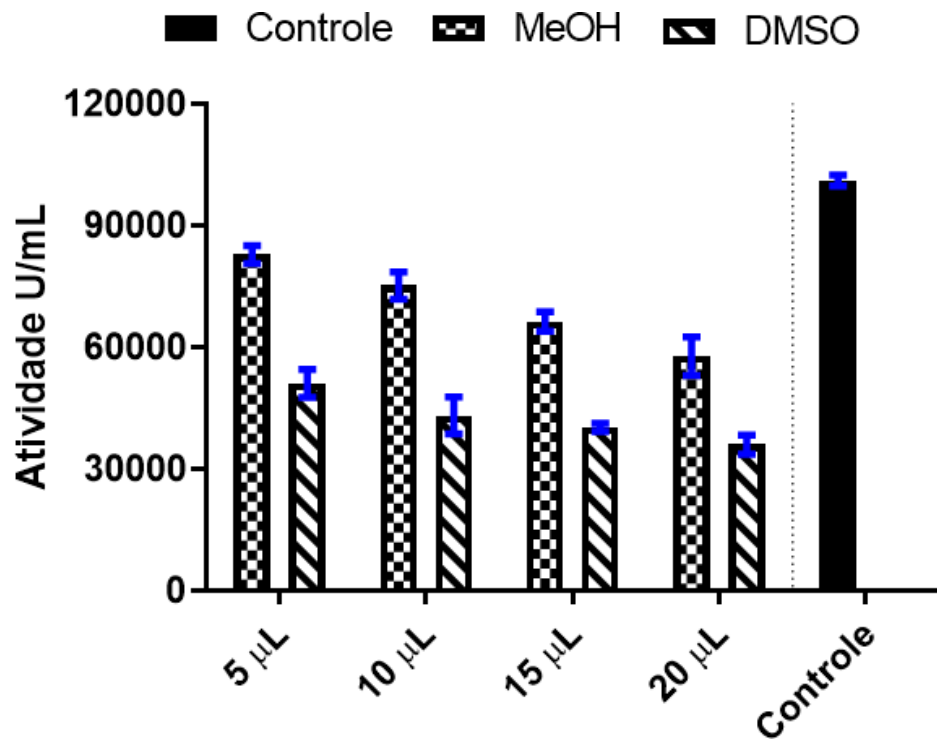
FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®] (Adaptado de EPIFÂNIO, 2011).

5.3 Avaliação Biológica dos Potenciais Inibidores de Lipase

5.3.1 Avaliação da Influência do Solvente na Atividade Biológica

No teste de solubilidade dos produtos, foram analisados solventes de diversas polaridades para encontrar a mais adequada, sendo DMSO e MeOH solventes compatíveis com as propriedades das duas classes de moléculas. Paralelamente, nesta etapa, iniciou-se o processo de biocompatibilidade dos solventes, analisados em ensaio fluorimétrico (**item 4.3.3.2**) na ausência de inibidor para verificação do comportamento da atividade catalítica em função do tipo de solvente e do volume fixo aplicado em meio reacional (**Figura 19**).

Figura 19 - Efeito de inibição em meio reacional do solvente MeOH e DMSO na atividade dalipase *C. rugosa* para determinação do protocolo do método flourimétrico.



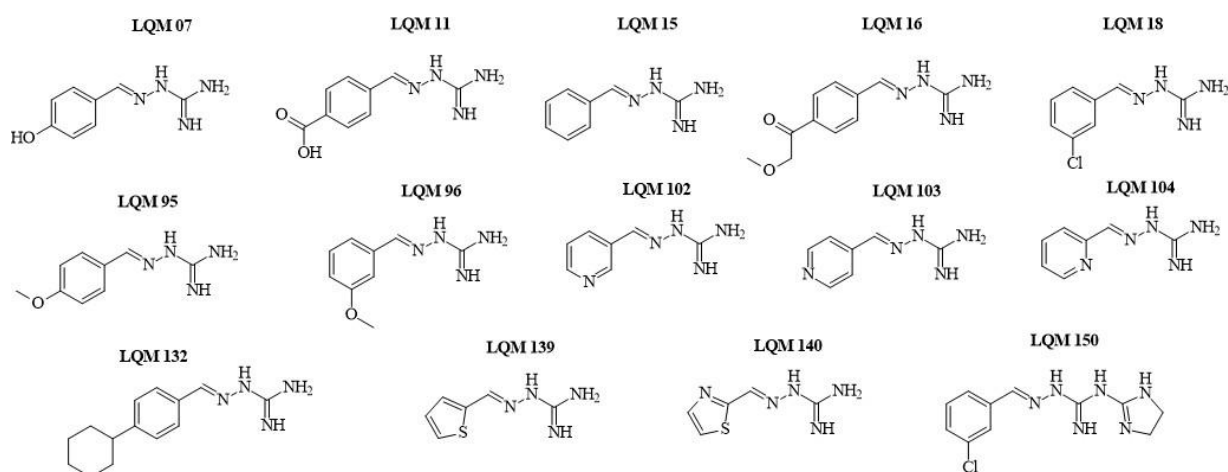
FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

Em geral, foi observado um comportamento padrão para todos os volumes fixos de solvente (5, 10, 15 e 20 µL) empregados na análise. O solvente DMSO apresentou alteração no comportamento catalítico, diminuindo a atividade de lipase *C. rugosa*, sendo mais agressivo para a enzima do que a presença de MeOH em meio reacional. Ambos solventes mostraram maior intensidade de inibição com o aumento do volume fixo em meio reacional de 200 µL (volume total). Devido a melhor conservação das propriedades catalíticas da enzima e do custo benefício de insumos, o solvente MeOH é estabelecido para o método fluorimétrico em todas as análises subsequentes. Por outro lado, apesar da escolha do solvente, pode-se constatar neste resultado o comportamento da atividade controle no qual foi aplicado volume fixo de 20 µL de água deionizada, enfatizando a importância de compostos inibidores enzimáticos serem solúveis em água ou solução tampão, gerando assim resultados mais precisos pela conservação da atividade catalítica.

5.3.2 Atividade Antilipase das Guanilhidrazonas Frente à Lipase de *Cândida rugosa*

Inicialmente, foram selecionadas guanilhidrazonas a partir da quimiotéca do laboratório, foram selecionadas moléculas com grande diversidade de grupamentos químicos mantendo o núcleo guanidínico como possível farmacóforo, afim de aumentar o alcance do *screening* biológico, direcionando a modificação estrutural nas etapas seguintes. Foram selecionados grupos aril-substituídos eletro-retiradores, eletro-doadores e hidrofóbico, bem como substituição em NH₂ terminal e farmacóforos com propriedades biológicas conhecidas (**Figura 20**).

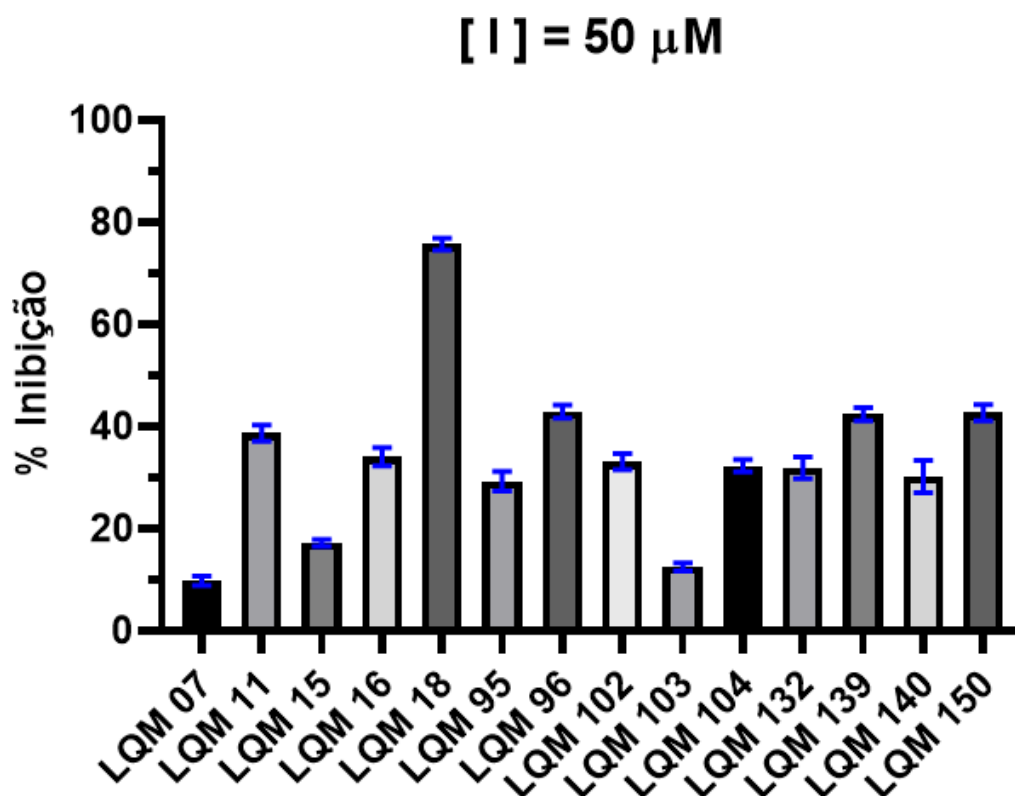
Figura 20 - Guanilhidrazonas selecionadas como candidatas à potencial atividade antilipase.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw Ultra 12.0®.

Durante esta etapa, o potencial de inibição foi medido em concentração fixa de 50µM em meio reacional. Foram analisadas 14 moléculas de características estruturais diferentes frente a lipase de *C. rugosa*, o resultado mostrou maior eficiência para o substituinte halogenado (LQM 18). A porcentagem de 75,7% de inibição à 50 µM em meio reacional de LQM 18 destacou-se dentre todos os outros derivados (**Figura 21**). Esta diferença bastante significativa também mostrou a importância da conservação do núcleo guanidínico e de NH₂ terminal, indicado pelo resultado de 42,7% de inibição apresentado por LQM 150, estruturalmente similar, diferenciado apenas pela região ciclizada das aminas terminais.

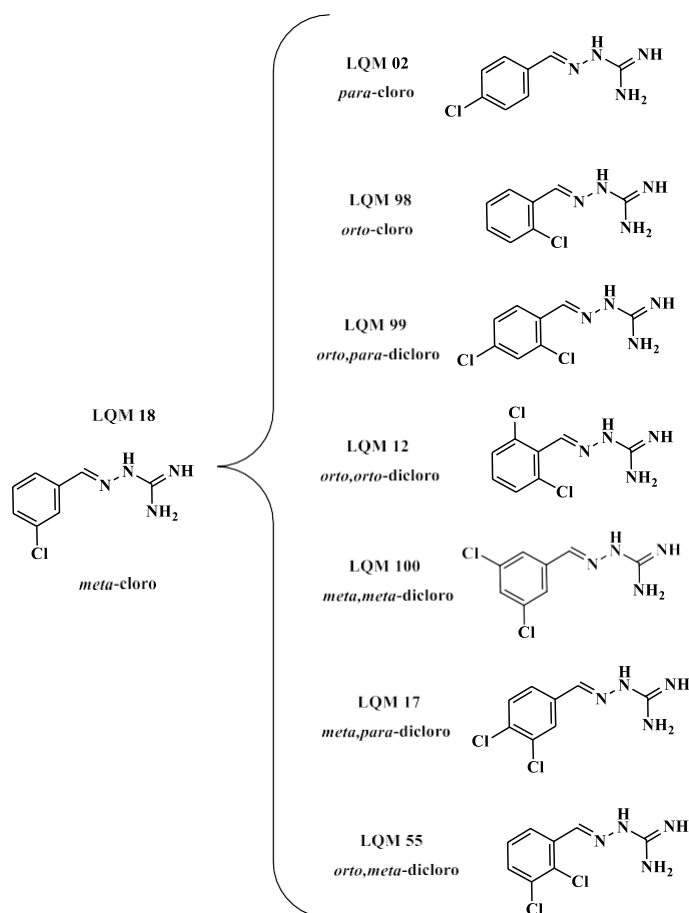
Figura 21 –Inibição dos candidatos com atividade antilipase ($[I] = 50 \mu\text{M}$)



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

Baseando-se nos resultados do gráfico anterior, o substituinte cloro na posição *meta* do anel aromático se mostra vantajoso na estrutura guanidínica. No entanto, apresentou menor eficiência na presença da amina terminal ciclizada. Desta forma, o afinilamento de estruturas em busca da otimização do resultado foi direcionado a introdução de cloro em diferentes substituições aromáticas. Foram selecionados para análise de menor concentração em meio reacional, as aminoguanidinas cloro-substituídas nas posições: *para*-cloro (LQM 02), *meta*-cloro (LQM 18), *orto*-cloro (LQM 98), *meta,para*-dicloro (LQM 17), *orto,para*-dicloro (LQM 99), *orto,orto*-dicloro (LQM 12), *meta,meta*-dicloro (LQM 100) (**Figura 22**).

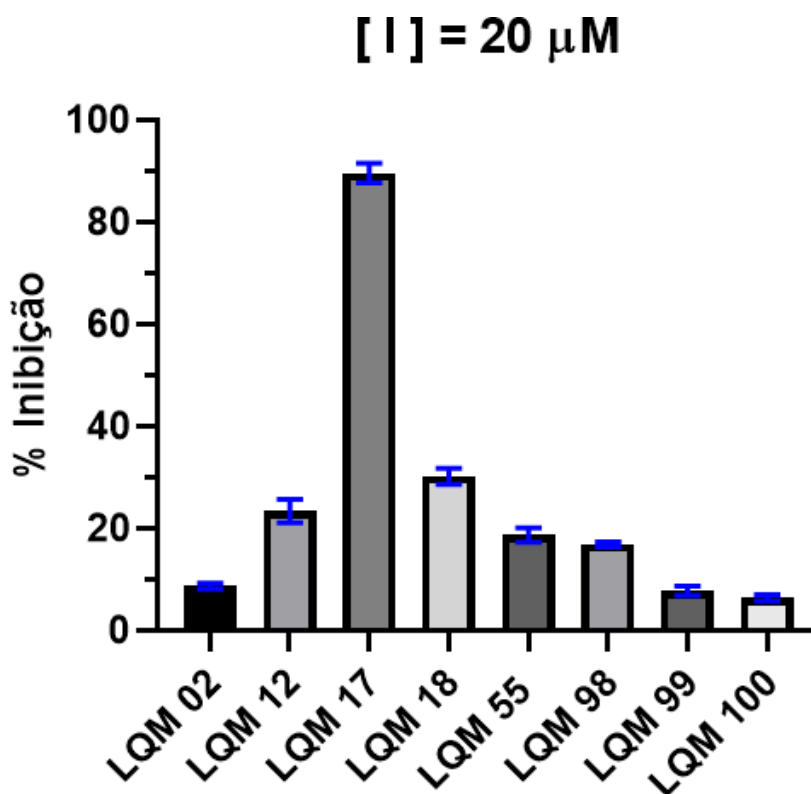
Figura 22 - Novos candidatos à potencial atividade antilipase derivados de LQM 18 para análise à 20 μ M em meio reacional.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Nesta etapa, o potencial de inibição foi medido em concentração fixa de 20 μ M em meio reacional. Foram analisadas 8 moléculas cloro-substituídas frente a lipase *C. rugosa*. O resultado mostrou maior eficiência para a substituição de dois cloros na posição *meta, para* (LQM 17). A estrutura anteriormente mais promissora à 50 μ M, LQM 18 manteve-se como o segundo candidato mais promissor nesta análise, apresentando porcentagem de inibição de 30,2%, enquanto que as outras estruturas apresentaram inibição abaixo de 30%. Contudo, os atributos de LQM 17 com a inserção de cloro nas posições *meta, para* substituído apresentou porcentagem de 89,6% de inibição, destacando-se com maior potencial antilipase dentre todos os derivados cloro-substituídos (**Figura 23**). Os resultados observados permitiram a continuidade da pesquisa para obtenção de dados cinéticos dos candidatos apresentados como mais promissores, LQM 17 e LQM 18, afim de caracterizar o comportamento em meio reacional através da concentração da molécula que inibe 50% (IC₅₀) das lipases em meio reacional, aplicado para analisar potencial de inibição e o comportamento cinético das mesmas.

Figura 23 - Inibição dos candidatos com atividade antilipase ($[I] = 20 \mu\text{M}$)

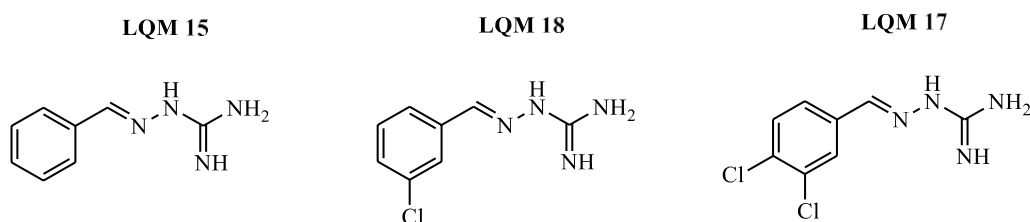


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

5.3.3 Determinação do Valor Cinético de IC_{50} de Candidatos Promissores

Baseando-se na significância dos resultados após duas varreduras de inibição enzimática com concentrações fixas de 50 e $20 \mu\text{M}$, respectivamente, foi possível constatar a eficiência de inibição da atividade catalítica de duas guanilhidrazonas, LQM 17 e LQM 18, dentro de dois conjuntos de moléculas da mesma classe. Desta forma, foi aplicado o método de determinação da curva dose-resposta de 50% da atividade inibitória máxima (**item 4.3.3.2.1**) dentro da faixa de concentração de agente inibidor de 1 à $100 \mu\text{M}$ frente a lipase de *C. rugosa*, utilizando o arcabouço estrutural inicial de AGH, a estrutura LQM 15 (sem substituíntes) como comparativo através da determinação da curva de LQM 15 (**Figura 24**).

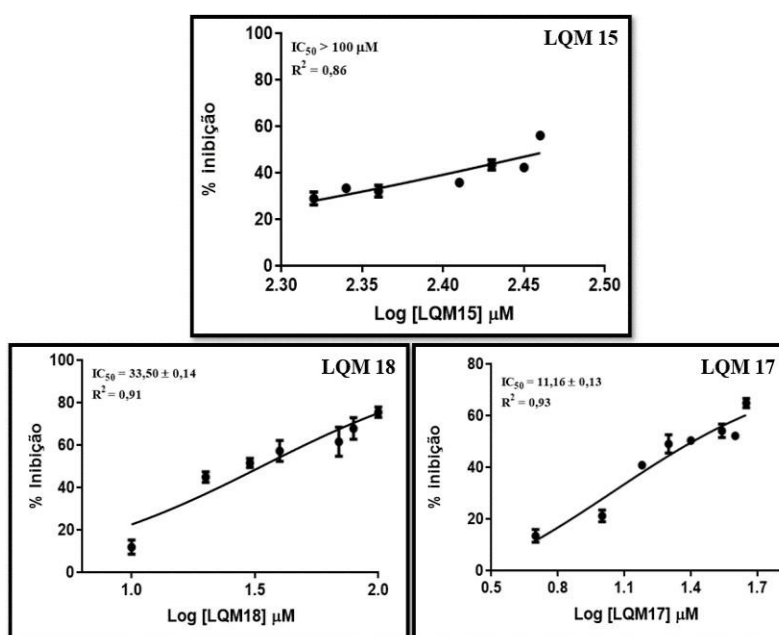
Figura 24 - Estruturas selecionadas para estudo cinético de IC_{50}



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Em geral, os ensaios fluorimétricos apresentaram boa distribuição dose-resposta dos valores atribuídos para cada concentração de inibidor analisada com desvio padrão e linearidade aceitáveis. A curva cinética está expressa em valores de Log da concentração do inibidor em μM *versus* a porcentagem. A avaliação de dose-resposta para LQM 17 apresentou IC_{50} de $11,16 \pm 0,13 \mu\text{M}$, superando o LQM 18, de $33,70 \pm 0,13 \mu\text{M}$ apresentado pelas curvas de inibição, enquanto LQM 15 não apresentou inibição significativa no teste cinético, avaliado com $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ (**Figura 25**). Estas análises indicaram através da comparação com LQM 15 a importância da modificação estrutural pela inserção de halogêneos em determinadas posições da região aromática destas guanilidrazonas, afim de potencializar sua ação frente a lipase.

Figura 25 - Curva dose resposta (Log [inibidor] *versus* % Inibição) de inibição da metade da atividade total (IC_{50}) de LQM 15, LQM 17 e LQM 18.



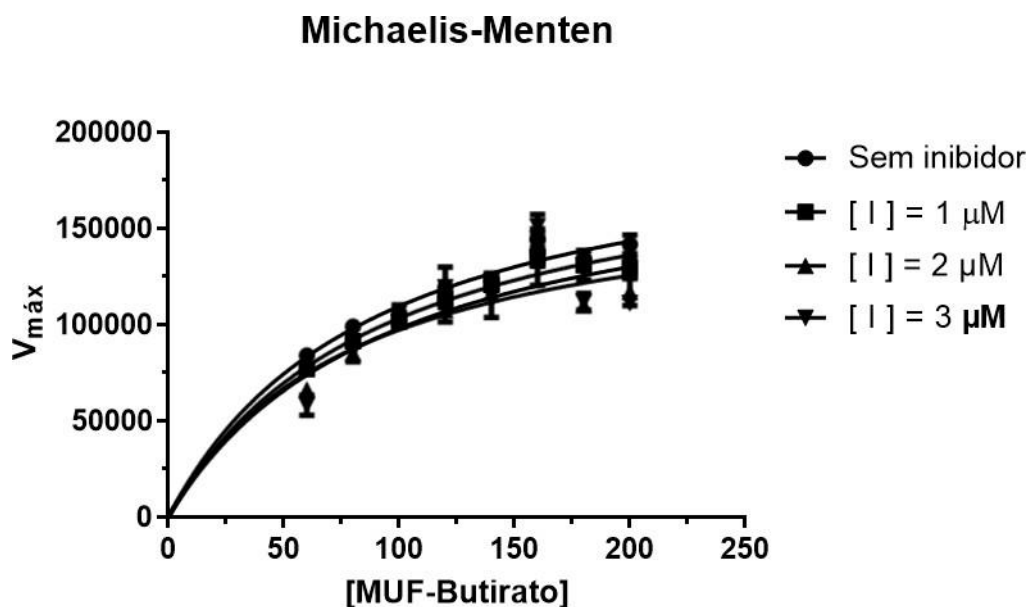
FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3[®].

5.3.4 Determinação do Valor Cinético de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ de LQM 17

Considerando o resultado promissor de IC_{50} para o candidato LQM 17 anteriormente apresentado. Foi feito o estudo cinético mais minucioso afim de conhecer a posição e a natureza da ligação do complexo *C.rugosa* lipase–LQM 17. A determinação da mudança na taxa de reação enzimática permite este tipo de caracterização, baseado nos componentes com características de ligante, a concentração de inibidor e substrato são os parâmetros experimentais em questão. As constantes K_M e $V_{m\acute{a}x}$ são de extrema importância no estudo e a compreensão do comportamento cinético da reação enzimática (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Baseado na reversibilidade desta inibição foi possível a determinação de K_M que permitiu a compreensão do mecanismo de catálise. Para cada curva cinética foi mensurada por concentrações fixas de inibidor ($[LQM\ 17] = 1, 2 \text{ e } 3\ \mu M$), sendo adicionado para cada leitura concentrações crescentes do substrato ($[MUF\text{-}Butirato] = 50 - 200\ \mu M$). Desta forma, conforme o aumenta a concentração do substrato, a reação é conduzida para formação do complexo (*C.rugosa* lipase-MUF butirato) até que a concentração de enzima livre seja extremamente pequeno, atingindo a saturação do meio reacional e o patamar de velocidade máxima (**Figura 26**).

Figura 26 - Curva cinética ($[MUF\text{-}Butirato]$ versus $V_{m\acute{a}x}$) de saturação da lipase para determinação da concentração de MUF-Butirato na metade da velocidade máxima (K_M).

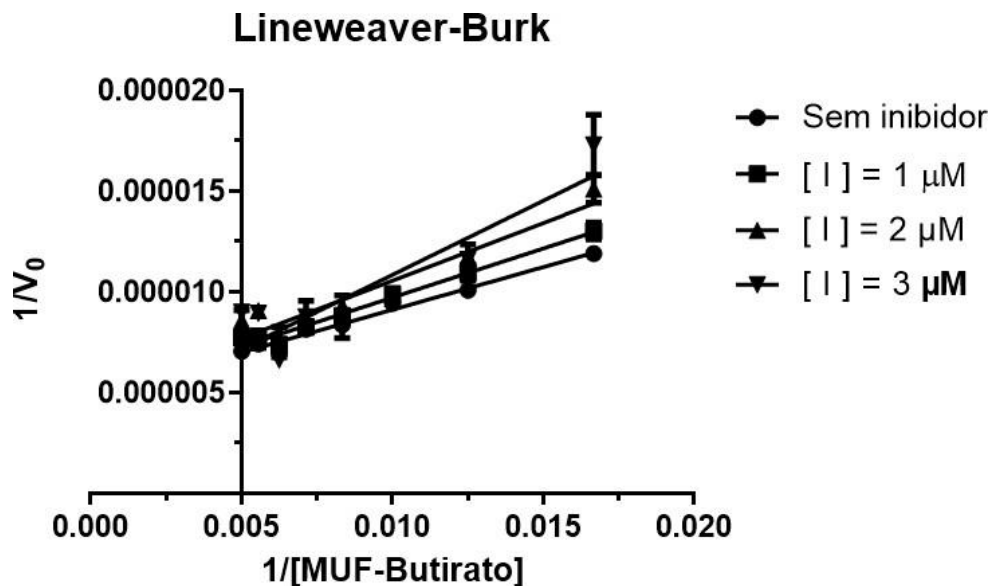


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

Nessas condições, a enzima atinge a saturação com o substrato de modo que aumentos adicionais de concentrações de substrato não tem efeito na taxa de reação, pois o efeito de saturação da catálise foi alcançado, portanto esta reação aproxima-se da velocidade máxima vinculada à atividade catalítica (PANASSE *et al.*, 1974; SIQUEIRA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2011; LEHNINGER *et al.*, 5ªed). A constante K_M fornece uma medida da concentração de substrato necessária para que ocorra uma catálise significativa, representado pela metade de $V_{máx}$. Existem evidências experimentais que sugerem que K_M fornece uma aproximação da concentração de substrato *in vivo* necessária para catálise (STRYER, 5ed).

Após os resultados obtidos a partir da curva cinética de Michaelis-Mentem, os mesmos foram computados para os valores recíprocos da taxa de reação e da concentração de substrato presente, considerando a presença e ausência de LQM 17. Os valores foram plotados através do gráfico Lineweaver-Burk para determinação da natureza da inibição. As retas apresentadas no gráfico apresentaram intersecção no eixo Y no mesmo ponto, revelando que a velocidade máxima não é afetada nesta cinética, no entanto as inclinações das retas são diferentes sugerindo os valores de K_M também diferentes (Figura 27).

Figura 27 - Transformação algébrica da equação de Michaelis-Mentem em duplo-recíproco de Lineweaver-Burk ($1/V_0$ versus $1/[MUF\text{-}Butirato]$) para determinação do mecanismo de inibição de LQM 17.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

Considerando o comportamento cinético de K_M e afeição do gráfico de Lineweaver-Burk, foi observado características intrínsecas de um inibidor competitivo, pois o fato de que a

velocidade máxima não é afetada reflete a competição do substrato e do inibidor pelo mesmo sítio ativo. O aumento da inclinação da reta resultado do acréscimo de inibidor é uma medida de quão forte o inibidor se liga à enzima e diminui a taxa de reação catalisada (GRAHAM *et al.*, 2013). Portanto, o comportamento de inibidor competitivo de LQM 17 pode ser constatado através de $V_{\text{máx}}$ constante (mínimas variações) enquanto K_M apresenta um crescimento significativo com o aumento da concentração do inibidor (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Valores não alterados de $V_{\text{máx}}$ e aumento da constante K_M na presença e ausência de LQM 17 refletindo no mecanismo competitivo da inibição.

[I]	0 μM	1 μM	2 μM	3 μM
K_M	125,3	135,8	150,8	176,9
$V_{\text{máx}}$	88,9	90,1	89,03	88,3

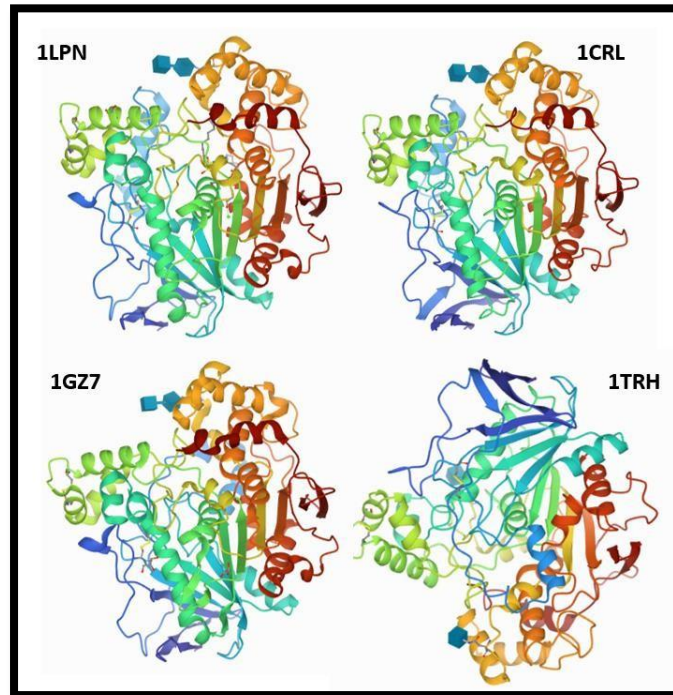
FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* Excel® 2016.

5.4 Modelo Computacional para novos Candidatos Potencialmente Promissores

5.4.1 Validação Gold *Software* dos Algoritmos para de lipase de *C. rugosa*

Após a obtenção dos resultados da avaliação biológica do derivado mais promissor (LQM 17) frente à lipase *C. rugosa*. Foi proposto o estudo de *screening* virtual para otimizar o tempo em busca de um protótipo melhor. Devido a diversidade biológica de estruturas de lipase e os algoritmos disponíveis para calcular a efetividade da formação do complexo enzima-ligante, foi necessária validação de todos algoritmos em função das quatro estruturas conformacionais da lipase de *C. rugosa* já conhecidas, disponíveis no PDB: 1LPN, 1CRL, 1GZ7 e 1TRH (**Figura 28**).

Figura 28 - Diferentes estruturas conformacionais de lipase de *C. rugosa* (PDB:1LPN, 1CRL,1GZ7 e 1TRH)



FONTE: *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank – RCSB PDB.*

A execução dos *dockings* para validação do algoritmo foram feitas pelo *software GOLD® v. 5.8.1* utilizando os ligantes naturais de cada enzima cristalográfica, sendo validados pelos algoritmos de encaixe *Chemical Piecewise Linear Potential (CHEMPLP)*, *GoldScore*, *ChemScore* e *Astex Statistical Potential (ASP)* (**Tabela 3**). O valor da função de pontuação mais próximo do valor de referência (0,0) foi eleito como o algoritmo adequado para análise neste modelo enzimático. A conformação de encaixe para 1CRL (lipase *C.rugosa* de conformação aberta) apresentou melhor valor de referência de 0,002 em função do algoritmo CHEMPLP, sendo este modelo utilizado para todas as análises de *docking* desta tese (**Tabela 3**).

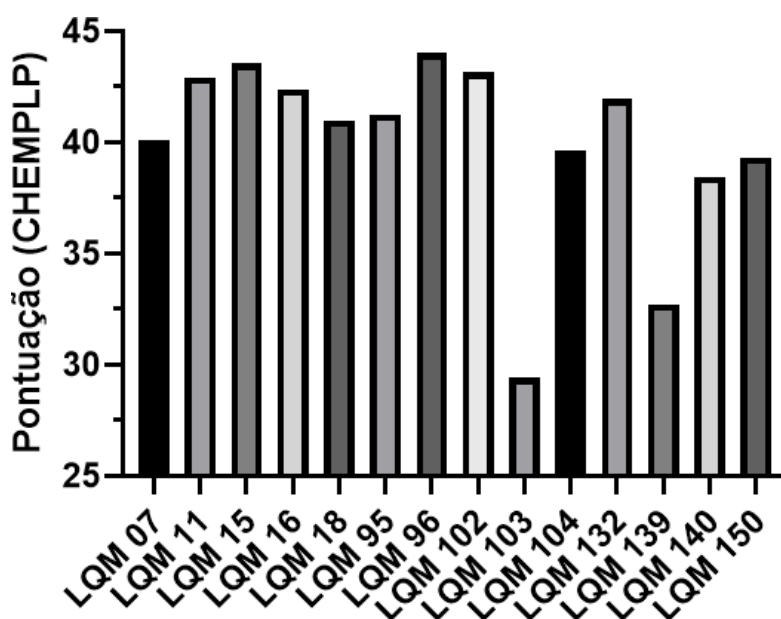
Tabela 3 - Pontuação dos complexos formados em diferentes conformações da lipase *C.rugosa* para validação do algoritmo em Gold Software

PDB	Algoritmo			
	<i>ChemPLP</i>	<i>Goldscore</i>	<i>Chemscore</i>	<i>ASP</i>
1LPN	2,57	1,23	1,728	1,121
1CRL	0,002	0,182	0,078	0,36
1TRH	0,105	0,198	0,085	0,242
1GZ7	0,317	0,082	0,116	0,157

FONTE: Autor, 2020. Tabela de valores geradas a partir do *software* GOLD® v. 5.8.1®.

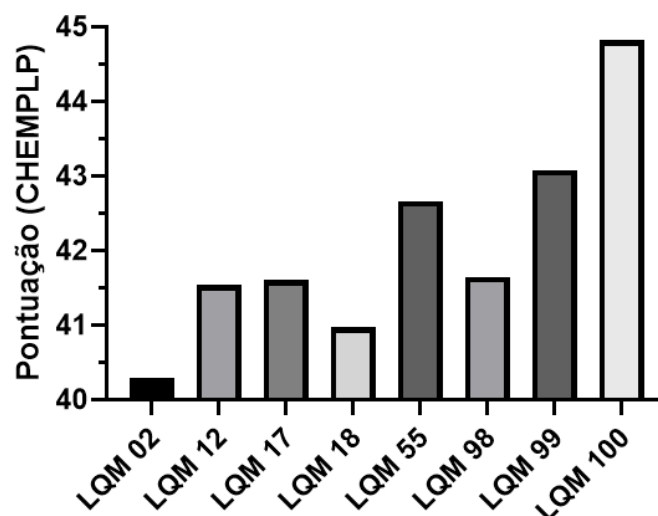
Inicialmente, foram calculados a pontuação de encaixe dos 14 compostos da primeira triagem resultando em um gráfico comparativo entre os compostos que apresentaram a maior parcela obteve pontuação acima de 40. (**Figura 29**). Enquanto que a análise da segunda triagem, apresentou em sua totalidade valores acima de 40, possivelmente devido a presença do cloro em diferentes posições em todas as moléculas, sugerindo o núcleo mais promissor (**Figura 30**). Todas as análises foram executadas pelo algoritmo CHEMPLP com a formação do complexo 1CRL-LQM.

Figura 29 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para primeira análise de triagem da atividade biológica



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

Figura 30 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para segunda análise detriagem da atividade biológica



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®

Em geral, os resultados apresentaram uma melhora quando analisados os complexos derivados de LQM 17, pois 35% dos compostos analisados na primeira triagem apresentaram resultados de pontuação abaixo de 40, enquanto a segunda análise mostrou todos os compostos acima de pontuação 40, sendo todos derivados de LQM 17. Em suma, considerando todas as moléculas AGH, foi observado que 77% (22 moléculas) estão acima da pontuação 40, sugerindo que a classe AGH apresenta-se promissora como inibidor de lipases (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Porcentagem de compostos com faixa de pontuação encaixe CHEMPLP de 40-45e menor que 40, referentes as duas triagens biológica iniciais.

Pontuação	40 - 45	< 40
1ª Triagem (14 compostos)	64%	35%
2ª Triagem (8 compostos)	100%	nenhum
Total (22 moléculas)	77%	23%

FONTE: Autor, 2020.

5.4.2 Planejamento e *Screening* Virtual de Novas Estruturas

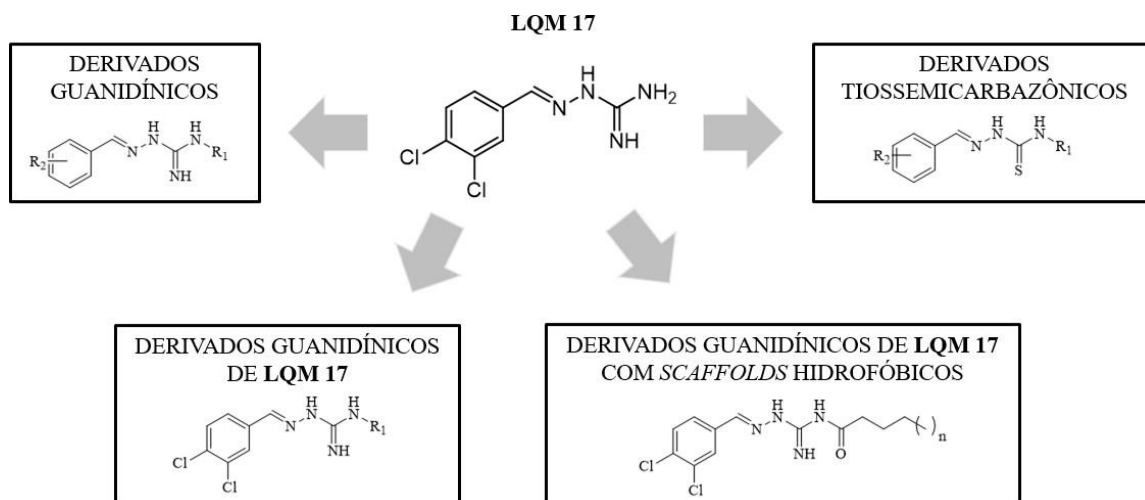
Considerando os experimentos iniciais deste trabalho, foram obtidos resultados promissores através de duas triagens biológicas e um estudo cinético, apresentando evidências do potencial de LQM 17. Contudo, os estudos de otimização e descoberta de fármacos, tem sido empregado com diversas ferramentas computacionais, considerado como incrementadores e facilitadores para o sucesso de uma pesquisa (KORB *et al.*, 2009). A busca pela otimização de LQM 17, norteou a aplicação da técnica computacional de triagem virtual (*screening*) nesta etapa do projeto.

As técnicas de *screening* virtual, otimizam a busca e a identificação de melhores candidatos a fármaco, permitindo avaliar um amplo espectro de estruturas moleculares através de análises computacionais de acoplamento com pequenas moléculas em específicos sítios de ligação das macromoléculas (KITCHEN *et al.*, 2004; KORB *et al.*, 2009). Deste modo, devido ao grande número de moléculas da classe guanilhidrazonas e tiossemicarbazonas disponíveis na quimióteca do Laboratório de Química Medicinal (LQM), separou-se em três grupos para análise computacional: derivados guanidínicos, derivados guanidínicos a partir de LQM 17 e derivados tiossemicarbazônicos.

Em geral, todas as estruturas foram avaliadas através da ferramenta de algoritmo e função de pontuação, no qual a escala progressiva de pontuação é diretamente proporcional a eficiência inibitória da molécula frente à estrutura tridimensional da lipase (1CRL). A técnica de algoritmo por pontuação de encaixe na formação do complexo ligante-macromolécula é considerada prática e eficiente para avaliação de grandes conjuntos de moléculas (KORB, 2009). Além das estruturas já sintetizadas e caracterizadas no laboratório (LQM), foram desenhados novos derivados guanidínicos de LQM 17, sendo planejados com base na literatura de *scaffolds* ativos em meio fisiológico de lipases, compondo o 4º grupo de estruturas analisadas juntamente com os três grupos de estruturas citado anteriormente.

No quarto grupo apresenta-se moléculas inéditas baseadas na literatura relacionada a moléculas antilipase. Segundo Alowe e colaboradores (1994), foi evidenciado um aumento abrupto da atividade de lipases em meio a interface lipídeo-água, sendo observado o aumento da atividade catalítica sempre na presença de moléculas anfipáticas. Considerando esta característica peculiar e de outras anteriormente apresentadas relacionadas ao maquinário enzimático de lipases (**item 2.5.1**), foi planejado a inserção de *scaffolds* hidrofóbicos na porção N-terminal da estrutura de LQM 17, afim de acrescentar características anfipáticas (**Figura 31**).

Figura 31 -Grupos de moléculas selecionadas para análise de *screening* virtual

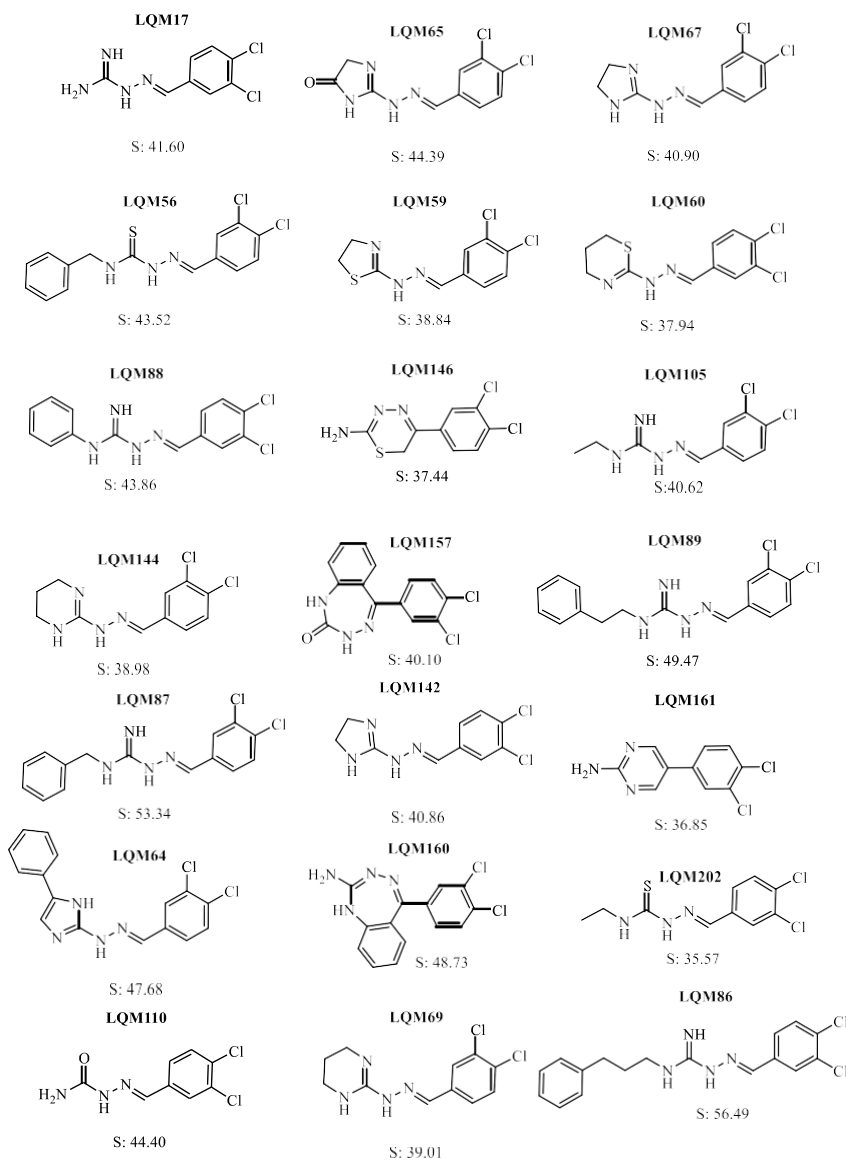


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

5.4.3 *Screening* Virtual de derivados do LQM 17 pelo *Software* Gold.

Inicialmente, foram selecionadas estruturas mais similares ao LQM 17, conservando as porções imina, *m*, *p* – dicloro substituído na região aromática e na presença de guanidina ou tiossemicarbazona. As estruturas de código LQM: 65, 67, 59, 60, 146, 157, 144, 142, 161, 164, 160, 169; são estruturas com a região *N*-terminal ciclizadas, enquanto que as demais estruturas não ciclizadas estão substituídas por *scaffolds* com propriedades hidrofóbicas, com exceção de LQM110 com esta região mais hidrofílica na presença de oxigênio. (**Figura 32**).

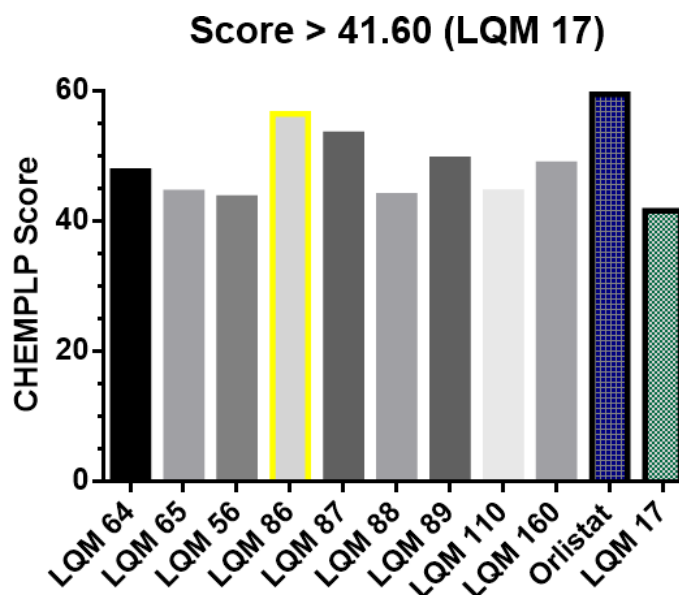
Figura 32 - Estrutura e score dos derivados do LQM 17 selecionados para análise de *screening* virtual.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

A seguir o gráfico apresenta os valores de pontuação das estruturas descritas na figura anterior. Foram consideradas no gráfico comparativo as estruturas que apresentaram pontuação acima de 41,60, referente ao melhor candidato LQM 17 biologicamente testado. Dentre 21 estruturas apenas 9 apresentaram potencial de encaixe maior que LQM 17. Sendo o LQM 86 o mais promissor dentre estes derivados, apresentando valor de pontuação encaixe de 56,49, no entanto ainda abaixo do inibidor de referência, o medicamento Orlistat com valor de pontuação encaixe de 59,46 (**Figura 33**).

Figura 33 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para derivados do LQM17 acima de 41,60

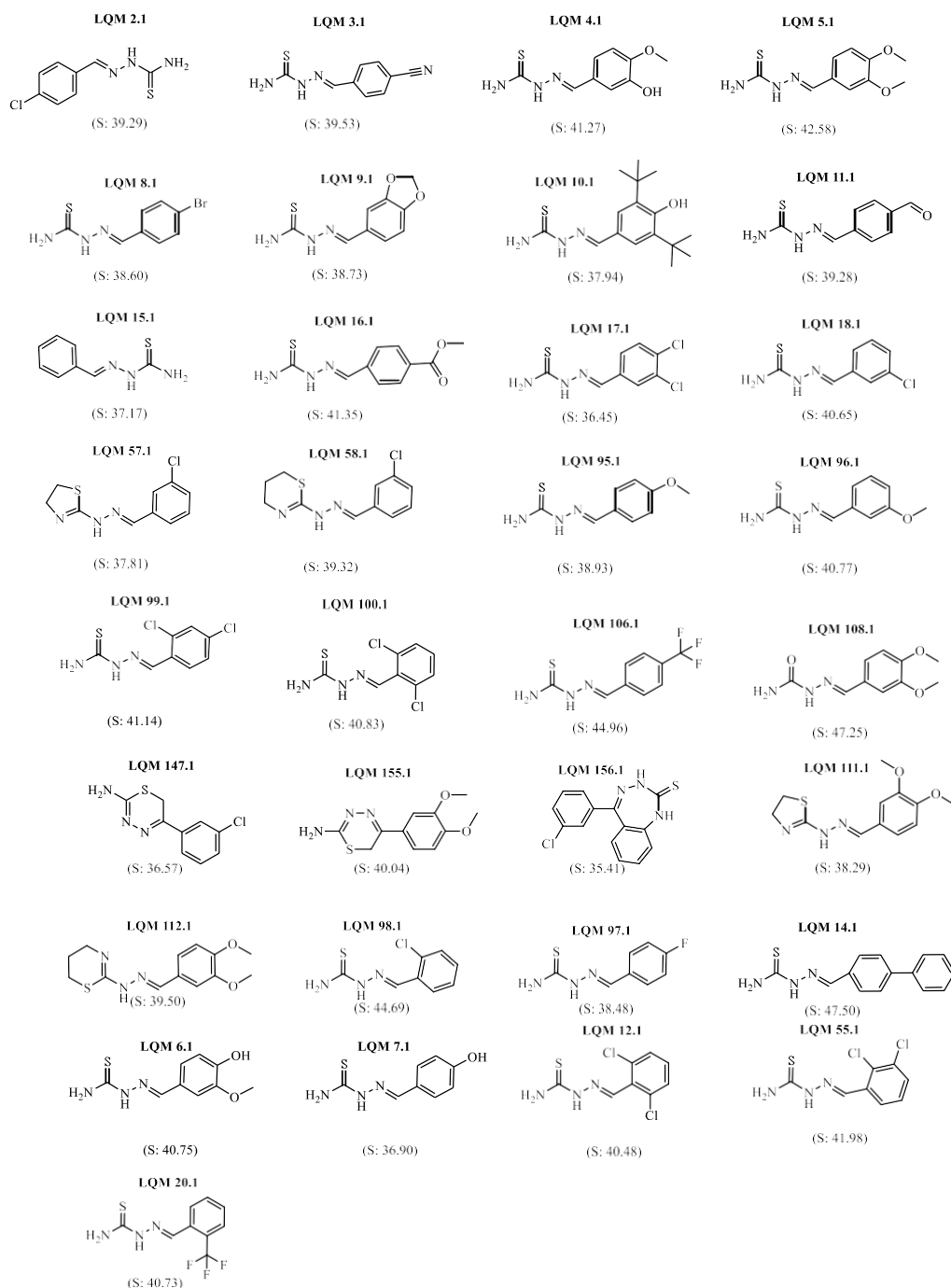


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

5.4.4 *Screening* Virtual de Tiossemicarbazonas pelo *Software* Gold.

Em geral, a classe das tiossemicarbazonas foram selecionadas e dentre todas as estruturas conservou-se a porção imina. As estruturas variam de modificações tanto na região *N*-terminal com estrutura ciclizada quanto na substituição aromática com propriedades eletroretiradoras e eletrodoadoras, além de grupos químicos com atividade farmacológica conhecida (**Figura 34**).

Figura 34 - Tiossemicarbazonas selecionadas para análise de *screening* virtual.

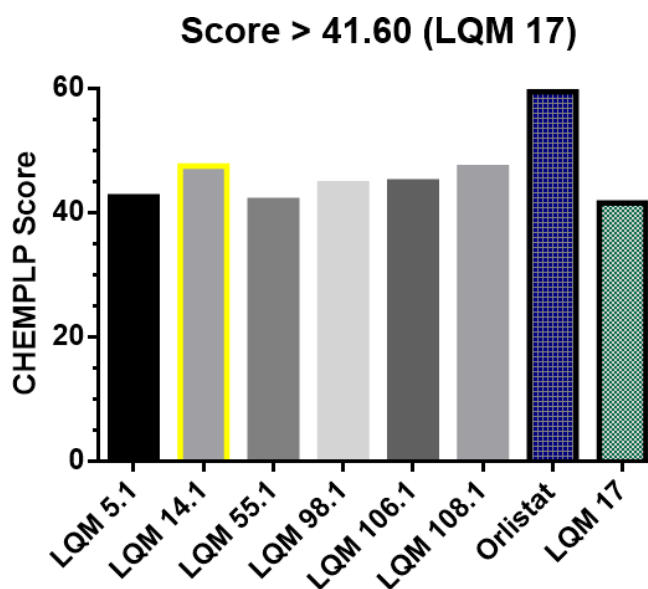


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

A seguir o gráfico apresenta os valores de pontuação das estruturas descritas na figura anterior. Contudo foram consideradas no gráfico comparativo as estruturas que apresentaram pontuação entre 41.98 (LQM 55.1) e 47.50 (LQM 14.1), sendo o LQM 14.1 o mais promissor

entre a classe TSC, no entanto ainda abaixo do medicamento Orlistat com valor de pontuação encaixe de 59,46 (**Figura 35**).

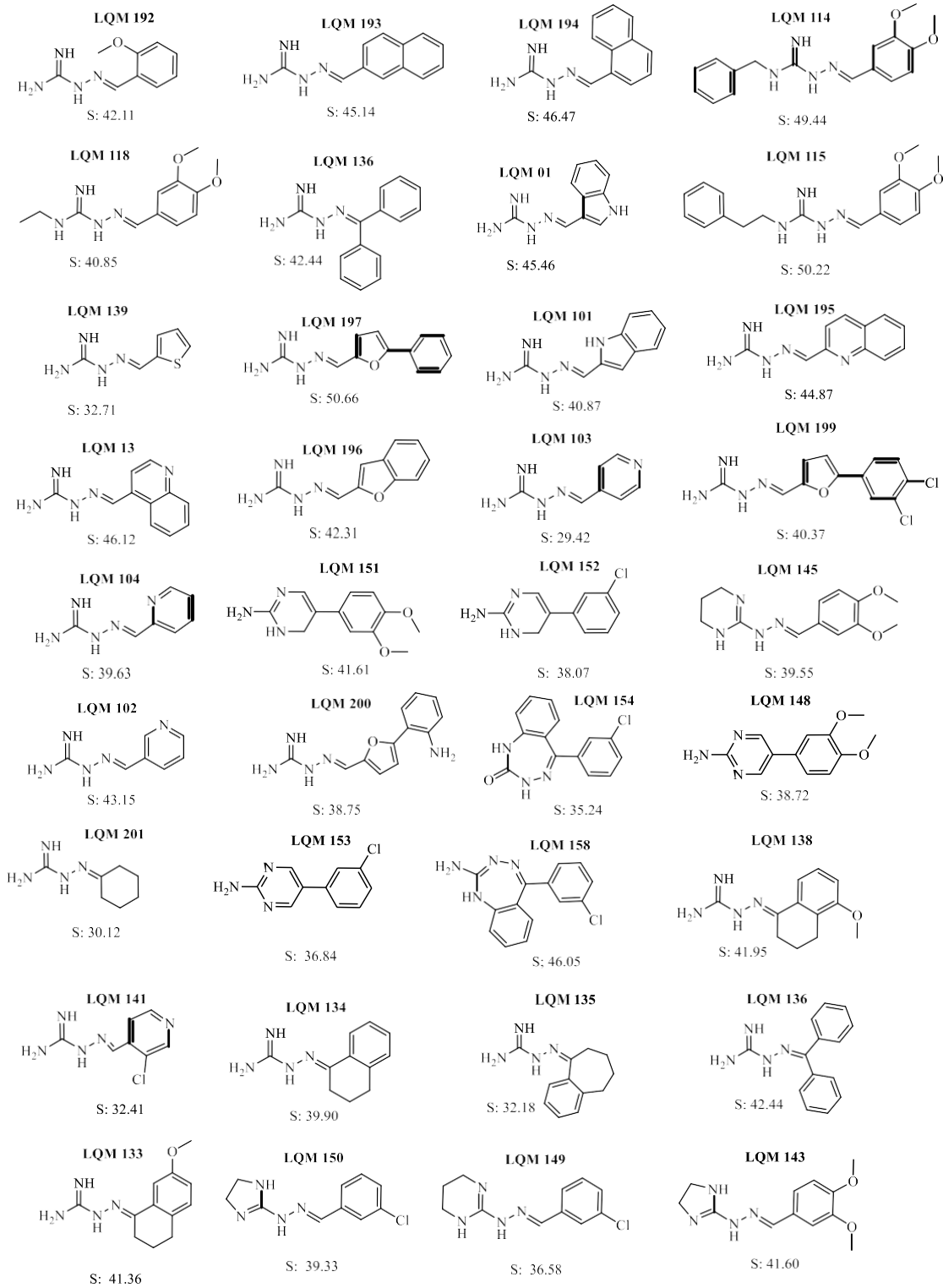
Figura 35 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para Tiossemicarbazonas com Score acima de 41.60.

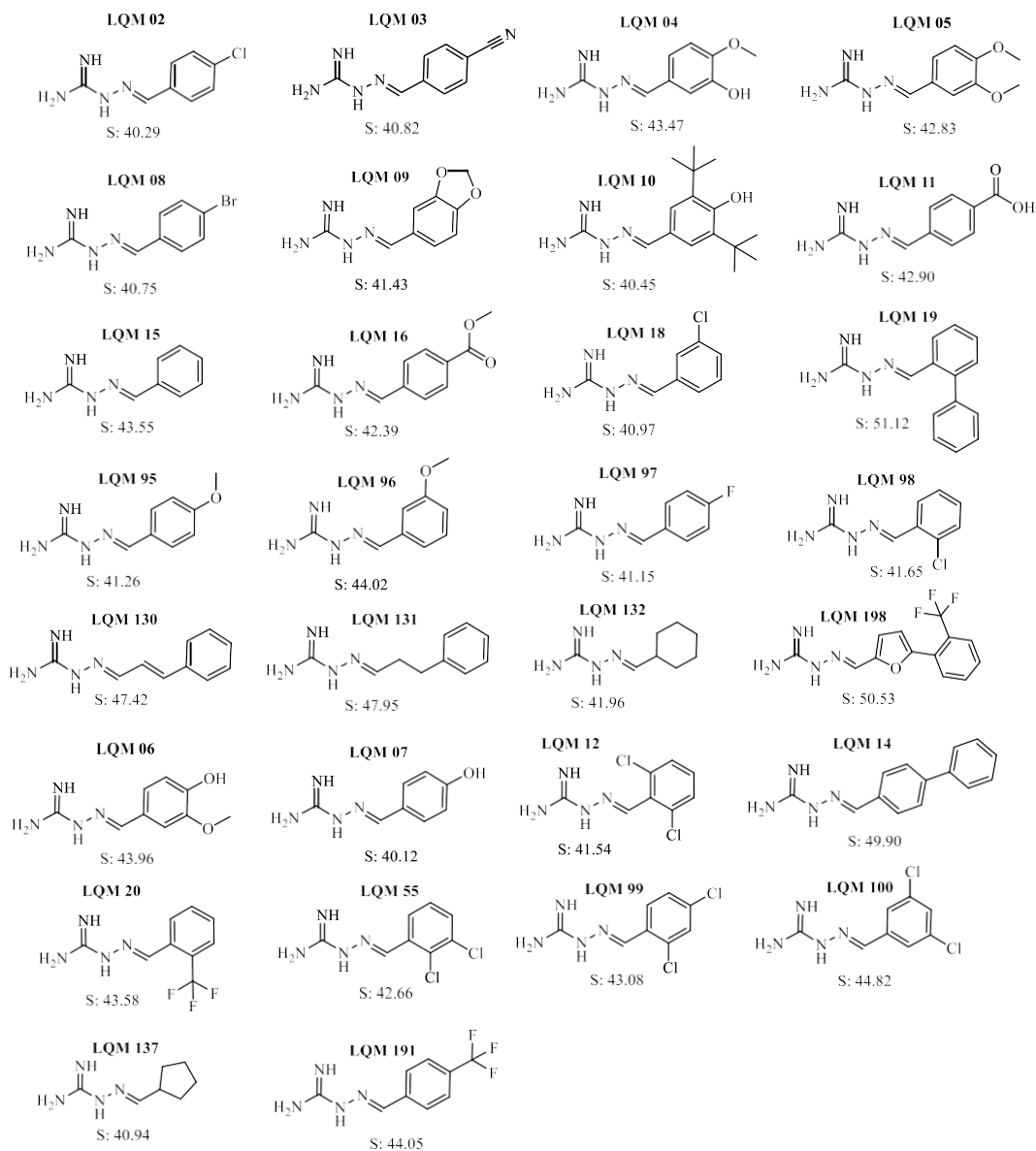


FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

5.4.5 *Screening* Virtual de Guanilidrazonas pelo *Software* Gold.

Além das estruturas derivadas de LQM 17 e tiossemicarbazonas, foram analisados em *Software* Gold pelo algoritmo CHEMPLP o valor de pontuação encaixe das guanilidrazonas com seu processo de rota sintética e caracterização já estabelecidos pelo laboratório. Totalizando 66 estruturas da classe guanilidrazonas com grande diversidade de *scaffolds*, possibilitando uma análise teórica mais minuciosa das propriedades de inibição desta classe de moléculas frente a enzima lipase *C.rugosa* (**Figura 36**).

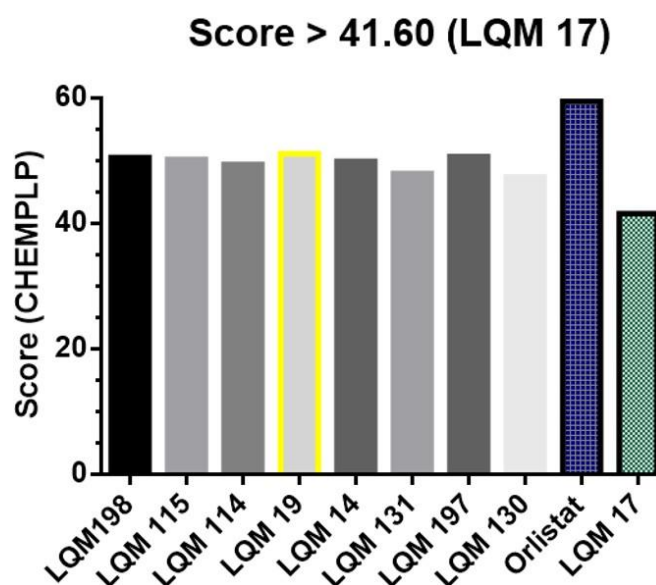
Figura 36 - Guanilidrazonas selecionadas para análise de *screening* virtual.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

A seguir o gráfico apresenta os valores de pontuação das estruturas descritas na figura anterior. De modo geral, uma grande parcela das estruturas guanilidrazonas apresentaram comportamento similar quando comparado com o valor inicial de 41,6 referente a pontuação encaixe de LQM 17, desta forma foi levado em consideração no gráfico comparativo as 8 estruturas de maior valor de pontuação. A molécula de código LQM 19 apresentou valor de 51,12 sendo o mais promissor dentre as guanilidrazonas deste grupo, no entanto manteve-se menor que o inibidor de referência, Orlistat com valor de pontuação encaixe de 59,46 (**Figura 37**).

Figura 37 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para Guanilidrazonas com Score acima de 41.60 mais significativos.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

5.4.6 *Screening* Virtual de derivados do LQM 17 com novos *scaffolds* pelo *Software* Gold.

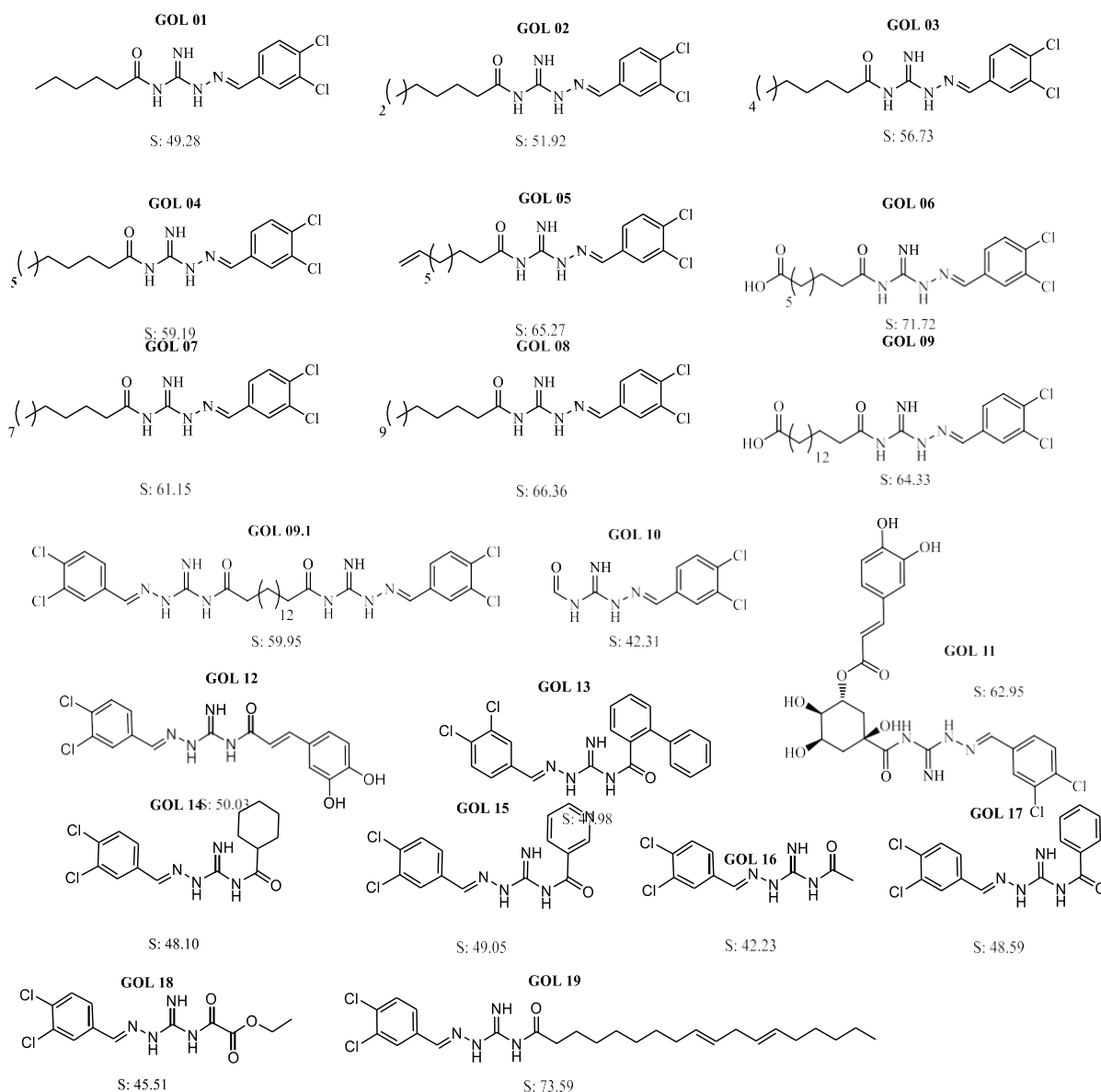
Após a determinação do valor de pontuação dos três grupos de estruturas, foram desenvolvidas estruturas inéditas, baseando-se na literatura de arranjo estrutural de lipases. Considerando as propriedades do meio fisiológico de lipases, foram planejadas estruturas com *scaffolds* hidrofóbicos simples na região *N*-terminal (GOL: 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 09.1, 19). Deste modo, foi inserido diferentes grupos com cadeia alifática, afim de aumentar as características anfipáticas de LQM 17. Além disso, foi adicionado uma ligação amida entre a porção hidrofóbica e o inibidor, pois este grupo funcional encontra-se descrito na literatura com excelente adaptação a meios biológicos.

Em geral, considerando grupos químicos específicos baseadas na literatura de lipase, foi possível planejar uma variedade de compostos inéditos. Cao *et al* (2020), Bustos *et al* (2018) e Miao *et al* (2020) apresentaram evidências do alto efeito inibitório ACG com comportamento cinético de uma inibição competitiva, desta forma, considerando estes resultados, foi introduzido na amina terminal de LQM 17 a porção ativa de ACG afim de potencializar a ação inibitória do composto *hit* em questão, analisando o complexo GOL11-1CRL. Além disso, outros compostos com grupos fenóis trouxeram mais uma gama de possibilidades de novas moléculas. Assim como fundamentado na seção terciária 2.3.3, compostos fenólicos como

ácido cafeico, quercetina, catequina, estilbenos e brousonona, mostraram valores de IC_{50} satisfatórios frente a lipases. Considerando estas referências, foi desenhado a estrutura mais simples dentre estas, a adição de uma molécula de ácido cafeico na amina terminal de LQM 17, gerando o protótipo GOL 12.

Baseado em estudos de biossíntese, a afinidade estrutural de pequenas moléculas na superfície de lipases mostra também possibilidades de *scaffolds* importantes para atividade biológica. Erlet *et al* (2019), Rocha *et al* (2010) e Sanfilipo *et al* (2013), apresentaram grupos bifênil capazes de interagir com a estrutura da enzima e participar espontaneamente de forma catalítica em meios reacionais. A estrutura de código GOL 13 foi planejada a partir da inserção do bifênil em LQM 17, para análise computacional do complexo GOL13-1CRL. Por fim, as outras inserções na amina terminal de LQM 17 baseiam-se na literatura de moléculas farmacologicamente ativas, afim de seguir os parâmetros de ADME e ampliar o leque de possibilidades de agentes inibidores de lipase que apresentem eficiência na interação com o alvo terapêutico (**Figura 38**).

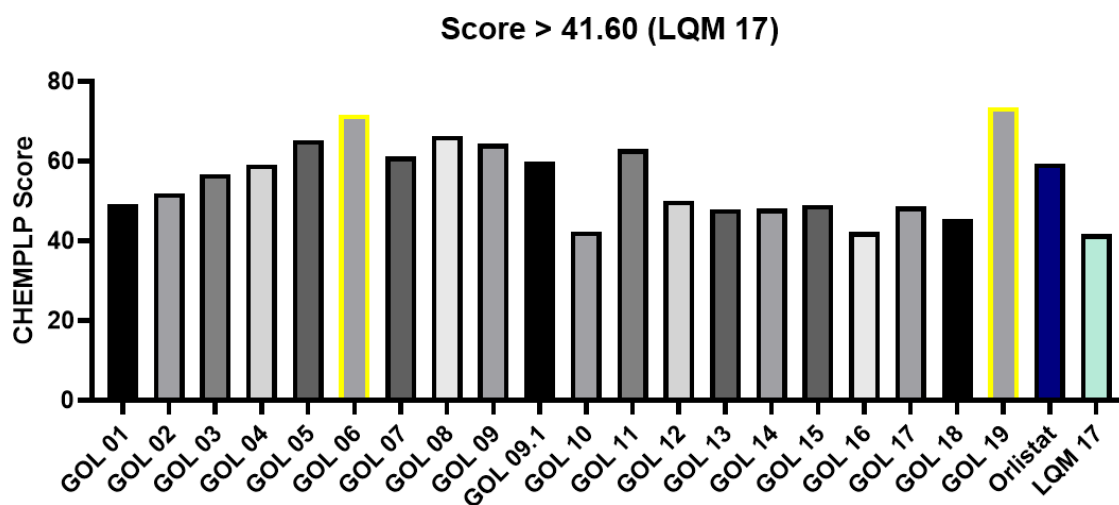
Figura 38 - Derivados de LQM 17 com *scaffold* hidrofóbico planejados para análise de *screening* virtual.



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw 17[®].

Após análise das pontuações pode-se constatar que a inserção de porções hidrofóbicas otimizou a eficiência do inibidor pela capacidade de mimetizar substratos naturais, como discutido anteriormente. Todas as estruturas planejadas apresentaram pontuação encaixe acima de 41,60 referente a LQM 17 (**Figura 39**). Com relação à referência padrão foram obtidos excelentes resultados com pontuação acima de Orlistat com valor de 59,46. As estruturas de código GOL: 05, 06, 07, 08, 09, 09.1, 11 e 19; foram promissoras com pontuação acima do medicamento atual, apresentando valores de pontuação encaixe de 65,27; 71,72; 61,15; 66,36; 64, 33; 59,95; 62,95; 73,59; respectivamente.

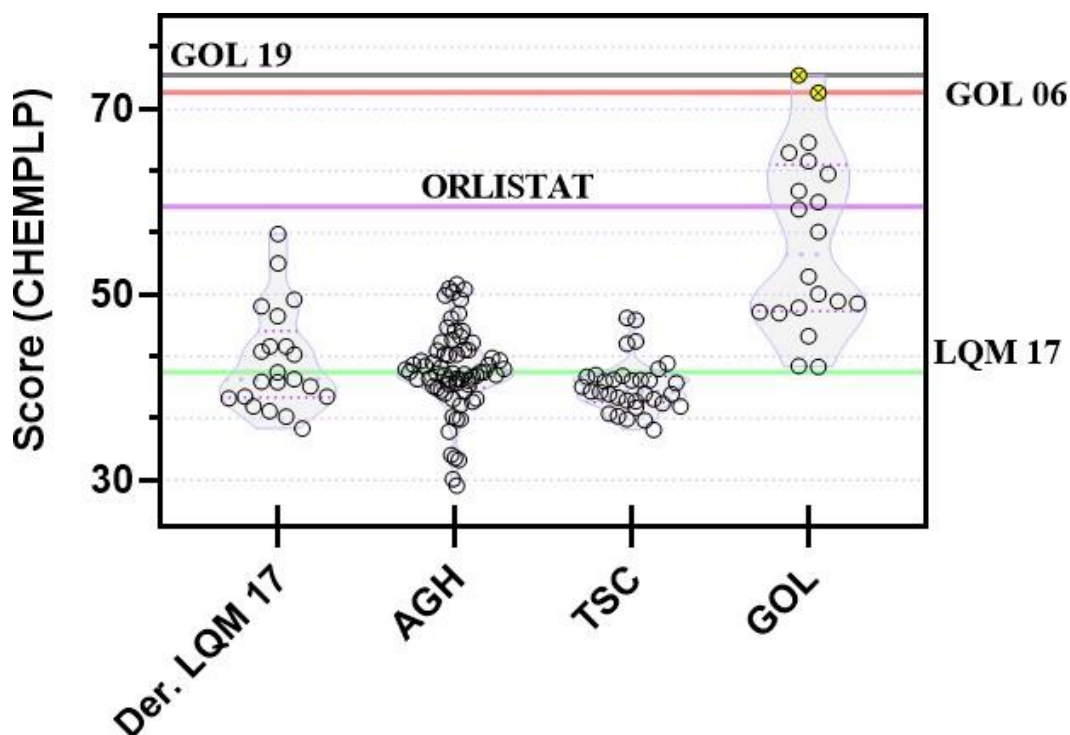
Figura 39 - Gráfico comparativo dos valores de pontuação CHEMPLP para derivados do LQM17 com novos *scaffolds* acima de 41,60.



FONTES: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

Em geral, os resultados apresentados mostram que a inserção de ácidos graxos N-substituídos e grupos químicos com atividade conhecida frente a lipase. Em geral, estas estruturas representam o grupo mais promissor dentre as análises realizadas aplicando o algoritmo CHEMPLP no *software* GOLD® v. 5.8.1 (**Figura 40**). Contudo, as estruturas planejadas de código GOL 06 e GOL 19 mostraram os maiores valores de pontuação encaixe de 71,72 e 73,59, respectivamente. A estrutura mais promissora pela adição de ácido linoleico (GOL 19) apresentou uma estratégia eficiente no aumento de afinidade pela lipase de *C.rugosa*. Em outro estudo com estrutura similar foi relatada por Magriotti et al (2004), demonstrando que ácidos oleicos mimetizados como o substrato natural são inibidores potentes da lipase pancreática, caracterizado como inibidor competitivo, trabalhando no esqueleto dorsal da trioleína.

Figura 40 - Gráfico dos valores de pontuação CHEMPLP de todas estruturas analisadas



FONTE: Autor, 2020. Figura elaborada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.4.3®.

Em geral, é possível afirmar que o aumento do caráter anfipático contribui fortemente para a energia de afinidade entre o inibidor e a enzima, considerando LQM 17 como um domínio polar e a inserção de grupos hidrofóbicos representando o domínio apolar. Contudo, a molécula mais promissora (GOL 19) dentre todas as estruturas avaliadas apresenta a estrutura do ácido linoleico como a melhor escolha de *scaffold*. Otimizando esta nova proposta, existem diversos estudos de ácidos linoleicos com propriedades de modificação do metabolismo da gordura corporal, sendo relatado com aplicações farmacológicas e incorporado em diversos tipos de óleos comestíveis para controle da obesidade (LI *et al.*, 2008; ZOU *et al.*, 2019). Além da redução de calorias ingeridas pela substituição de óleos comestíveis por óleo linoleico, também se relata perda de peso corporal, redução do tecido adiposo em quantidades significativas e aumento de gasto energético em camundongos (GOSH *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2008). Apesar dos benefícios contra a obesidade, as investigações para descobrir quais são os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos antiobesidade, permanecem em grande parte desconhecidos (LI *et al.*, 2008).

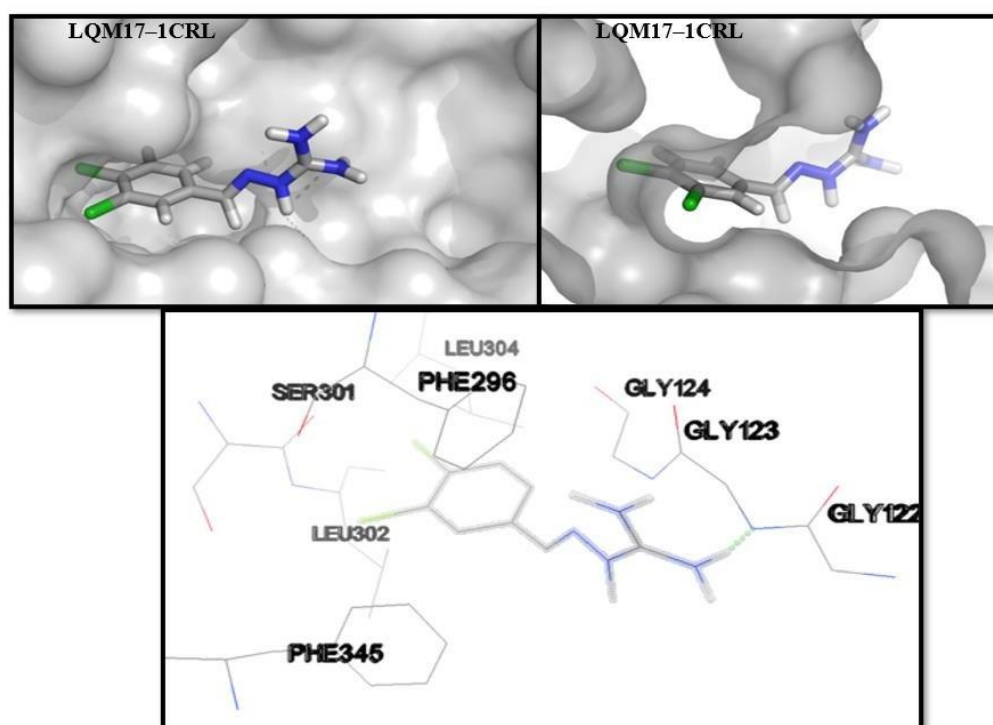
Baseando-se nestas informações, as características biológicas de ambas porções (polar e apolar) de GOL 19, apresentam propriedades conhecidas em diversas áreas, sendo positivo

na contribuição para o desenvolvimento de um fármaco seguro para o consumo humano. Portanto, foi dado continuidade ao trabalho *in silico*, de modo a caracterizar minuciosamente os resíduos de aminoácidos envolvidos na região de interação do inibidor LQM 17 pois resultou em resultados biológicos satisfatórios e GOL 19 pela máxima pontuação encaixe calculado.

5.4.7 Docking molecular dos candidatos promissores LQM 17 e GOL 19

Foram feitos estudos de *docking* molecular para LQM 17 e GOL 19 em interação com *C. rugosa* lipase (PDB: 1CRL). Os resultados de *docking* molecular para o complexo LQM17-1CRL apresentou pontuação encaixe de 41,60. Foi identificado uma cavidade no qual obteve-se maior afinidade, apresentando visualmente a porção aromática dentro do bolso hidrofóbico. Os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação foram Gly122; 123; 124; Leu304, 302; Phe296, 302; Ser301, a posição do anel aromático de LQM 17 é estabilizada por interação do tipo π - π paralelo deslocado com Phe 296 e 345, a região de ligação diferente do sítio ativo, sugerindo uma região alostérica de lipase de *C. rugosa* (**Figura 41**).

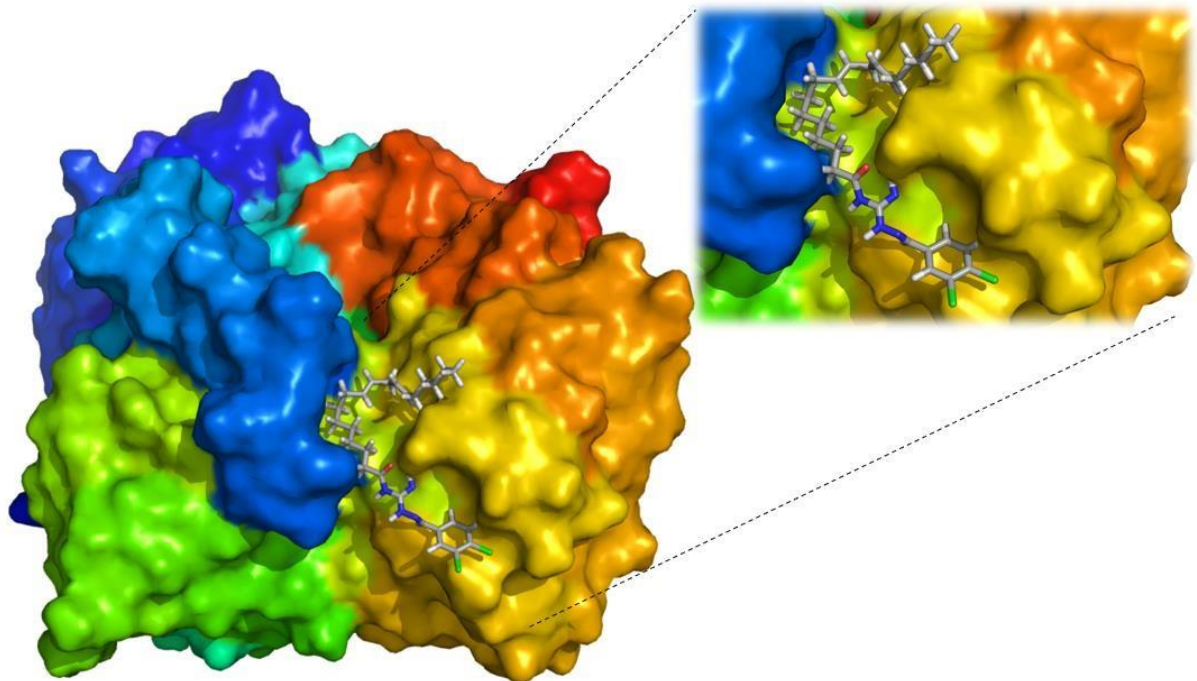
Figura 41 - Ilustração da região de interação do complexo LQM17-1CRL



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMOL® v. 0.99.

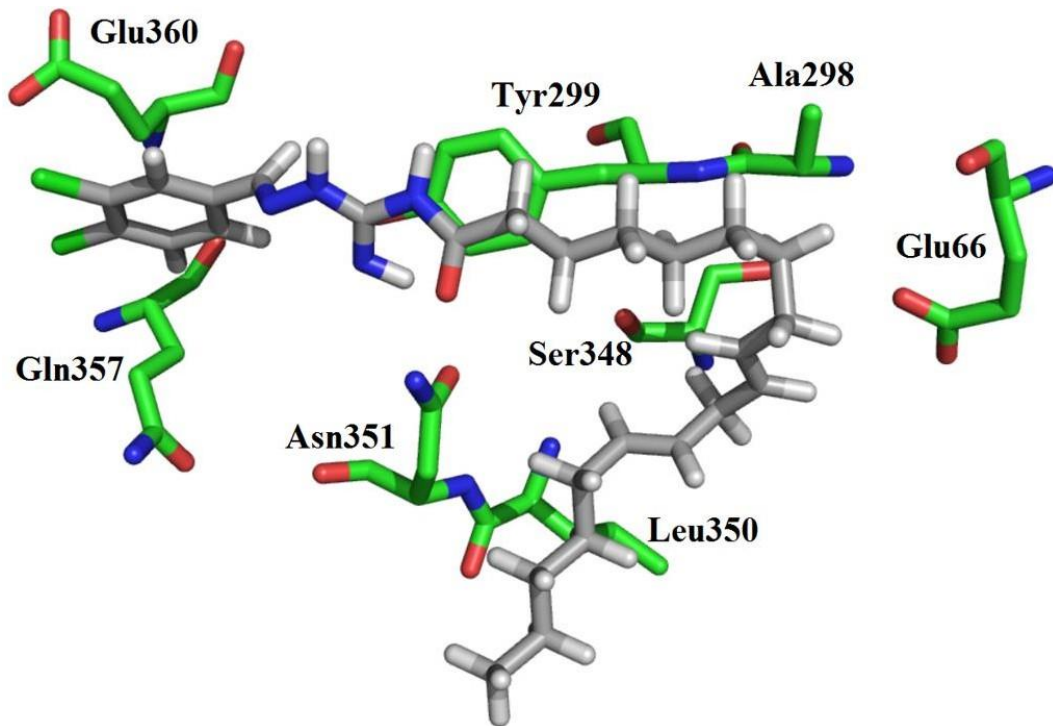
As interações do complexo GOL19-1CRL obtiveram maiores contribuições energéticas gerando pontuação encaixe de 73,59, deste modo, sendo o maior potencial antilipase dentre todas as moléculas. De acordo com as análises em *docking*, o inibidor se ligou na mesma região do substrato, já complexado na lipase 1CRL, sugerindo a característica de um inibidor do tipo competitivo (**Figura 42**). Na região do substrato interagiu com os principais resíduos de aminoácidos Glu360, Gln357, Tyr299, Ala298, Glu66, Ser348, Leu350, Asn351; não havendo ligações de hidrogênio apenas os contatos hidrofóbicos se destacaram nesta ligação (**Figura 43**).

Figura 42 - Ilustração da região do sítio ativo de interação do complexo GOL19-1CRL



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMOL® v. 0.99.

Figura 43 - Ilustração da região do sítio ativo de interação do complexo GOL19-1CRL



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMOL® v. 0.99.

6 CONCLUSÃO

O percurso experimental e os resultados obtidos deste trabalho, permitiu constatar que as classes de AGH e TSC podem ser uma ferramenta útil para o planejamento racional de compostos ativos frente a lipase. Todos os derivados apresentaram determinado grau de afinidade frente a enzima estudada, tanto os resultados experimentais como os teóricos puderam mostrar os níveis; leve, moderado e alto de reatividade e afinidade pelo alvo.

De acordo com a etapa inicial, as triagens biológicas aplicadas foram importantes para a identificação do esqueleto estrutural de AGH, a inserção do cloro na porção aromática apresentou LQM 18 com 30,2% de inibição e LQM 17 com 89,6% de inibição. Contudo, a caracterização cinética de LQM 17 mostrou o potencial antilipase com valor satisfatório de IC_{50} equivalente a 11,16 μ M e natureza de inibição competitiva. Assim, LQM 17 apresentou um arcabouço promissor para o planejamento de estruturas inéditas de atividade inibitória frente a lipase.

A técnica de *screening* virtual identificou o composto LQM 86 dentre o grupo do banco de moléculas do laboratório, com valor de pontuação encaixe de 56,49, próximo ao medicamento Orlistat de 59,49. Em suma, as estruturas mais promissoras dentre o total de moléculas analisadas foram em grande parte atribuída ao grupo de estruturas inéditas, sendo destaque as moléculas de código GOL 06 e GOL 19 com pontuação encaixe de 71,72 e 73,59, respectivamente; sendo GOL 19 sugerido por *docking* molecular com natureza de inibição competitiva.

Por fim, este trabalho apresenta uma nova possibilidade de desenvolvimento de protótipos inibidores de lipase a partir da classe AGH, sendo assim, as estruturas promissoras comprovadas pelos resultados obtidos, trazem um arcabouço farmacologicamente aceito, propondo estruturas inéditas e contribuindo para ampliação de candidatos a fármaco, permitindo fortalecer a busca por segurança e eficiência no tratamento da obesidade.

7 PERSPECTIVAS

Diante das evidências experimentais e teóricas, o presente trabalho abre uma gama de possíveis desenhos estruturais baseados no arcabouço de AGH, além das melhores estruturas: LQM 86, LQM 17, GOL 06 e GOL 19. Prontamente, a estrutura de LQM 86, molécula atribuída ao grupo de moléculas do laboratório, considerado uma molécula promissora pelo *docking* molecular, pode ser mensurada a atividade biológica para determinação do IC₅₀. Enquanto que GOL 06 e GOL 19, são do grupo de moléculas inéditas, faz-se necessário o planejamento da rota sintética para a formação da ligação amida a partir de um ácido graxo e a amina terminal de LQM 17, e assim dar continuidade com atividade biológica.

Em geral, apesar de obter resultados que indicam quatro estruturas promissoras, GOL 19 permanece como melhor candidato dentre estes, pois o ácido linoleico utilizado como *scaffold* apresenta aplicação na indústria de alimentos, o que permite uma viabilidade e aceitação por ADME. Além disso, pesquisas relatam sua ação antiobesidade por diversos mecanismos moleculares, ainda desconhecidos, o qual pode corroborar com estudos deste óleo através das propriedades de interação com a lipase pancreática. Contudo, GOL 19 apresenta uma perspectiva muito promissora para o desenvolvimento de um inibidor de lipase potente e seletivo, sendo assim, um excelente candidato como medicamento antiobesidade.

REFERÊNCIAS

- ALOWE, E. Pancreatic Triglyceride Lipase and Colipase. **Gastroenterology**, v. 107, n. 1524–1636, p. 1524–1536. 1994.
- ANDERSON J.W. Orlistat for the management of overweight individuals and obesity: a review of potential for the 60-mg, over-the-counter dosage. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**; v. 8, p. 1733–1742, 2007.
- ANDREANI, A.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; RECANATINI, M.; GARALIENE, V. Potential antitumor agents. Part 29: Synthesis and potential coanthracyclinic activity of imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.8, n.9, p.2359– 2366, 2000.
- ASHWELL, M. S.; CEDDIA, R. P.; HOUSE, R. L. Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid alters hepatic gene expression in a polygenic obese line of mice displaying hepatic lipidosis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 848–855, 2010.
- BAL, B. S.; FINELLI, F. C.; SHOPE, T. R.; KOCH, T. R.; Nutritional deficiencies after bariatric surgery. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 9, p. 544–556, 2012.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. **Química nova**, v. 25, p. 39-44, 2001.
- BELLE V.; FOURNEL A.; WOULDSTRA M.; RANALDI S.; PRIERI F.; THOMÉ V.; CARRIÈRE F. Probing the opening of the pancreatic lipase lid using site-directed spin labeling and EPR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 46, p. 2205–2214, 2007.
- BERG, J. M.; TYMOCZOKO, J. L.; STYER, L. **Biochemistry**, 6. Ed. 2006.
- BHARTI, N.; HUSSAIN, K.; GARZA, M. T. G.; VEGA, D. E. C.; GARZA, J. C.; CARDENAS, B. D. M.; NAQVI, F. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 3475, 2002.
- BHATRAJU, P. K. *et al.* Covid-19 in Critically Ill Patients in the Seattle Region — Case Series. **The new england journal of medicine**. v. 22, p. 382, 2020.
- BING, H.; FENGCHAO, C.; FANGPING, Y.; XIAOXIONG, Z.; Yi S.; YUNQI, Li. Caffeoylquinic acids competitively inhibit pancreatic lipase through binding to the catalytic triad. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2015.
- BLACKBURN, G. L; MCCOWEN, K. C; KHAODIHIAR, L; Obesity and Its Comorbid Conditions; **Clinical Cornestone**. Obesity, v. 2, n. 3. 1980.
- BORGES, M.N.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. NMR interaction studies of aromatic guanyl hydrazones with micelles: model for mechanism of action of cationic antibiotics. **Biopolymers**, v.62, n.1, 9–14, 2001.
- BORGSTRÖM B. Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. **Biochimica et Biophysica Acta**. n. 962, p. 308–316. 1988.

BOWDEN, A. C. *et al.* Analysis and interpretation of enzyme kinetic data, **Reporting Enzymology Data - Strenda Recommendations and Beyond**. v. 1, p. 121-125, 2014.

BRAY, G. *et al.* **Obesity and the Metabolic Syndrome**. Ed. 1. 2007

BRZOZOWSKI, Z.; SACZEWSKI, F.; SLAWINSKI, J. Synthesis of novel 3-amino-2-(4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonyl)-guanidine derivatives as potential antitumor agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42 p. 1218-1225, 2007.

BUDUMA, K.; CHINDE, S.; DOMMATI, A. K. Synthesis and evaluation of anticancer and antiobesity activity of 1-ethoxy carbonyl-3,5-bis (30 -indolyl methylene)-4-piperidone analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 2016.

CHAKHTOURA, M.; RAHME, M.; FULEIHAN, G. E. Vitamin D Metabolism in Bariatric Surgery. **Endocrinology and Metabolism Clinics of NA**. v. 46, n. 4, p. 947–982. 2017.

CHEN, M.; GAO, Z.; YAN, W. Discovery and characterization of a stable lipase with preference toward long-chain fatty acids. **Biotechnology Letters** v. 42, p. 171–180, 2020.

CHEN, YING.; CHEONG, Ling- Zhi. Et al. Lipase-catalyzed selective enrichment of omega-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols of cod liver and linseed oils: Modeling the binding affinity of lipases and fatty acids. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 123, p. 261-268. 2019.

CLAUDIA, S.; ANGELA, P.; ANTONIETTA, D. B.; DAVIDE, F.; DELOGUB, G. Lipase behavior in the stereoselective transesterification of zingerol-like derivatives and related biphenyls. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2013.

COLMAN, E. Anorectics on Trial: A Half Century of Federal Regulation of Prescription Appetite Suppressants. **History of Medicine**. v. 143, p. 380-385, 2005.

CRESPAN, M. Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 108, p. 231-237, 2004.

CURRAN, M. P.; SCOTT LJ. Orlistat. **Adis Drug Avaluation** v. 64, p. 2845–2864, 2004.

EDMONT, D. *et al.* Synthesis and evaluation of quinoline carboxyguanidines as antidiabetic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n.16, p.1831-1834, 2000.

EMA – European Medicines Agency, Alli (previously Orlistat GSK). Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/alli-previously-orlistat-gsk_ Acesso em: 10 maio de 2019.

EPIFÂNIO, W. A. N. Síntese e Avaliação Citolóxica de Derivados Aminoguanidínicos Planejados como Protótipos de Fármacos Antineoplásicos. **Dissertação de Mestrado**, 2011.

FDA – **Food Drug Administration** - Orlistat (marketed as Alli and Xenical). Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/orlistat-marketed-alli-and-xenical-information>. Acesso em: 10 de Maio de 2019

FEDELE, D.; FRANCESCO, A.; RISO, S.; COLLO, A. Obesity, malnutrition, and trace element deficiency in the coronavirus disease (COVID-19) pandemic: An overview. **Nutrition**. v. 81, p. 111016, 2020.

FERGUSON, R. Actubudua arguta - the hardy kiwifruit. **New Zealand Kiwifruit**. v. 81, p. 23-24, 1991.

FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P.; ALMASSIAN, B.; COLACINO, E.; FISCHER, J.; MACDONALD, S.; **Cancer Chemother. Pharmacology**, v.50, p. 223. 2002.

FINER, N.; GARNETT, S. P.; BRUU, J. M. COVID-19 and obesity. **Clinical Obesity**. v. 10, p. 12365. 2020.

GADAD, A.K.; MAHAJANSHETTI, C.S.; NIMBALKAR, S.; RAICHURKAR, A. Synthesis and antibacterial activity of some 5- guanylylhydrazone/thiocyanato-6-arylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 853–857, 2000.

GARZA A.L.; MILAGRO F.I.; BOQUE N.; CAMPIÓN J.; MARTÍNEZ J.A. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. **Planta Medica**, v. 77, p. 773–785, 2011.

GHOSH, S. *et al.* Linoleic acid in diets of mice increases total endocannabinoid levels in bowel and liver: modification by dietary glucose. **Obesity Science & Practice**. v. 5, n. 4, p. 383–394. 2019.

GLANTD, M.; RAZ, I.; Present and Future: Pharmacologic Treatment of Obesity. **Journal of Obesity**. p. 43-56. 2011.

HADVÁRY P.; HOCHULI E.; KUPFER E.; LENGSELD H.; WEIBEL EK.. Leucine derivatives, US patent 4,598,089. 1986.

HADVÁRY P; LENGSELD H; WOLFER H. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. **Biochemical Journal**. v. 256, p. 357–361, 1988.

HAINER V. Overview of new antiobesity drugs. **Expert Opinion on Pharmacotherapy** v. 15, p. 1975–1978. 2014.

HAN T.S.; SATTAR N.; LEAN M. Assessment of obesity and its clinical implications. **BMJ** 2006;333: 695–698. doi:10.1136/bmj.333.7570.695.

HARTMANN D; EAIN Y.; GUZELHAN C.; ODINK J. Effect on dietary fat absorption of orlistat, administered at different times relative to meal intake. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 36, p. 266–270, 1993.

HASHIMOTO Y.; KAWANISHI K.; TOMITA H.; MORIYASU M.; UHARA Y.; KATO A. Enflourage Chromatography: A New Technique for Identifying Volatile Components in a Small Amount of Samples from Natural Occurrence. **Analytical Letters**, v. 16, p. 317–322, 1983.

HEIALY, Saba Al.; HACHIN, Mahmood Yaseen. Et al. Combination of obesity and comorbidities leads to unfavorable outcomes in COVID-19 patients. **Journal Pre-proofs**, 2020.

HENNESS S.; PERRY C.M. Orlistat. **Drugs**, v. 66, p. 1625–1656. 2006

HIRSCHLER B, GSK. Recalls weight-loss drug Alli in US on tampering concerns, Disponível em: <https://www.reuters.com/article/us-gsk-alli/gsk-recalls-weight-loss-drug-alli-in-u-s-on-tampering-concerns-idUSBREA2Q12K20140327>. Acesso em: 14 maio 2019.

HOCHULI E.; KUPFER E.; MAURER R.; MEISTER W.; MERCADAL Y.; SCHMIDT, K. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*: II Chemistry and structure elucidation. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, p. 1086–1091, 1986.

HOFFMAN, B. B. *et al.* Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Ed. 10, p. 163-203. 2003.

HOLLANDER P. A.; ELBEIN S. C.; HIRSCHI, B.; KELLEY D.; MCGILL J.; TAYLOR T.; WEISS S.R.; CROCKETT S.E.; KAPLAN R.A.; COMSTOCK J.; LUCAS C.P.; LODEWICK P.A.; CANOVATCHEL W.; CHUNG J; HAUPTMAN J. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes: A 1-year randomized double-blind study. **Diabetes Care**, v. 21, n. 8, p. 94-128, 1998.

HOON, J.; LIU, Q.; LEE, C.; AHN, M.; YOO, H.; YEON, B.; KYEONG, M.; A new pancreatic lipase inhibitor from *Broussonetia kanzinoki*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, n. 8, p. 2760–2763. 2012.

HOPMANN, C.; KURS, M.; MUELLER, G.; TOTI, L. Percyquinnin, a process for its production and its use as a pharmaceutical. US 6596518B2. 2003.

HOWARD C. *et al.* Chemoselective Approaches to Glycoprotein Assembly. **Accounts of Chemical Research**. v. 34, p. 727-736, 2001

HUSSAIN, A.; MAHAWAR, K. *et al.* Obesity and mortality of COVID-19. Meta-analysis. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 14, n. 4, p. 295–300, 2020.

JANGS, D. S. *et al.* A new pancreatic lipase inhibitor isolated from the roots of *Actinidia arguta*. **Archives of Pharmacal Research**. v. 31, p. 666-670, 2008.

JANNA E.; JENNY K.; NADINE Z.; MATTHIAS P. Lipase-Catalyzed Chemoselective Ester Hydrolysis of Biomimetically Coupled Aryls for the Synthesis of Unsymmetric Biphenyl Esters. **Molecules**, v. 24, p. 4272; 2019.

JAYAWARDENA, R.; JEYAKUMAR, D. T.; MISRA, A. *et al.* Obesity: A potential risk factor for infection and mortality in the current COVID-19 epidemic. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, p. 1871-4021, 2020.

JOHNSON, K. A. *et al.* A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 587, n. 17, p. 2753-2766, 2013.

JUNIOR, J. C. G. C. Purificação Parcial e caracterização de uma TAG – lipase do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais*. **Dissertação de mestrado**. UFAL 2016.

KANETOSHI A.; INOUE S.; ANETAI M.; FUJIMOTO T.; AOYAGI M.; SATO M. An *in Vitro* Screening Test for Anti-cancer Components of Wild Plants in Hokkaido. *European Journal of Biological Research*, v. 55, p.49, 2005.

KASUGA, N. C.; SEKINO, K.; ISHIKAWA, M.; HONDA, A.; YOKOYAMA, M.; NAKANO, S.; SHIMADA, N.; KOUMO, C.; NOMIYA, K. J. **Inorganic Biochemistry**, v.96, p.298, 2003.

KIM, J.G.; XIAO, P. G. Traditional Drugs of the East Color Edition. **Young-Rim Publishing Co.** v. 207, 1995.

KIM, Y.; LEE, E. W.; EORN, S. H.; KIM, T. H. Pancreatic lipase inhibitory stilbenoids from the roots of *Vitis vinifera*. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, p. 97-100.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews - drug discovery**, v. 3, 2004.

KLAYMAN, D. L.; LIN, A. J.; MCCALL, J. W.; WANG, S. Y.; TOWNSON, S.; GRÖGL, M.; KINNAMON, K. E. J. **Medicinal Chemistry**, v.34, p.1422, 1991.

KOPELMAN P.; DE GROOT H.G.; RISSANEN A.; ROSSNER S.; TOUBRO S.; PALMER R.; HICKLING R.I. Weight Loss, HbA1c Reduction, and Tolerability of Cetilistat in a Randomized, Placebo-controlled Phase 2 Trial in Obese Diabetics: Comparison With Orlistat (Xenical). **Obesity**,v. 18, p. 108–115, 2010.

KORB, O.; STU-TZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 84–96, 2009.

KUCHEL, P. W. *et al.* Schaum's outline of Biochemistry. Ed. 3. 2009.

KUMAR M.S.; VERMA V.; SONI S.; RAO A.S.P. Identification and Process Development for enhanced Production of Lipstatin from *Streptomyces Toxytricini* and further Downstream Processing. **Advances in Biotechnology**, v. 11, p. 06–11, 2012.

KUMAR P.; DUBEY K.K. Current trends and future prospects of lipstatin: A lipase inhibitor and pro-drug for obesity. **RSC Advances**, v. 5, p. 86954–86966, 2015.

KUMARA, R.; GOOMBERA, S.; KAUR, J. Engineering lipases for temperature adaptation: Structure function correlation. **Proteins and Proteomics**. 2019.

LENILSON C. R.; ISAC, G. R.; RODRIGO F. L.; CRISTIANO R.; ANDRÉ L. Kinetic resolution of iodophenylethanols by *candida antarctica* lipase and their application for the synthesis of chiral biphenyl compounds. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 21, p. 926–929, 2010.

LI, F.; LI, W.; FU H.; ZHANG Q.; KOIKE K. Pancreatic Lipase-Inhibiting Triterpenoid Saponins from Fruits of *Acanthopanax senticosus*. **Chemical Pharmaceutucal Bulletin** v. 55, n.7, p. 1087—1089, 2007.

LI, J.; LUO, X.; WANG, Q.; ZHENG, L.; KING, I.; DOYLE, T. W.; CHEN, S.; **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.**, v.8, n.3159, 1998.

LI, J.; HUANG C. J.; XIE D. Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 631, n. 52, p. 631 – 645, 2008.

LI, W.; YANGA, B.; WANG Y.; WEI D.; WHITELEY C.; WANG X. Molecular modeling of substrate selectivity of *Candida antarctica* lipase B and *Candida rugosa* lipase towards c9, t11- and t10, c12-conjugated linoleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 299-303, 2009.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, 2005.

LIU, T.; LIU, X. T.; CHEN, Q. X.; SHI, Y. Lipase Inhibitors for Obesity: A Review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 128, p. 110314, 2020.

LOOKENE, A.; BENGTSSON-OLIVECRONA G. Chymotryptic cleavage of lipoprotein lipase: Identification of cleavage sites and functional studies of the truncated molecule. **European Journal of Biochemistry**, v. 213, p. 185–194, 1993.

LOUIE, J. K. *et al.* A Novel Risk Factor for a Novel Virus: Obesity and 2009 Pandemic Influenza A (H1N1). Division of Communicable Disease Control, v. 52, n. 3, p. 12, 2011.

LOWE, M.E. The triglyceride lipases of the pancreas. **Journal of Lipid Research**, v. 43, 2002.

LUTHRA, R.C.; UMESH R.C.; DUBEY R.C. Medium optimization of lipstatin from *Streptomyces toxytricini* ATCC 19813 by shake flask study. **International Journal of Microbiology**, v. 4, p. 266-269, 2012.

LUTHRA, U.; KUMAR H.; KULSHRESHTHA N.; TRIPATHI A.; TRIVEDI A.; KHADPEKAR S.; CHATURVEDI A.; DUBEY R.C. Medium optimization for the production of lipstatin by *Streptomyces toxytricini* using full factorial design of experiment. **International Journal of Microbiology**, v. 11, p. 73-76, 2012.

MAGRIOTI, V.; VERGER R.; CONSTANTINO-KOKOTOU V. Triacylglycerols Based on 2-(N-tert-Butoxycarbonylamino) Oleic Acid Are Potent Inhibitors of Pancreatic Lipase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 288–291, 2004.

MELISSA, S. A., *et al.* Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid alters hepatic gene expression in apolygenic obese line of mice displaying hepatic lipidosis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 9, p. 848-855, 2010.

MENTESE, E.; YILMAZ, F.; EMIRIK, M.; ÜLKER, S.; KAHVECI, B. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of some benzimidazole derivatives as potent pancreatic lipase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 76, p. 478–486, 2017.

MESSEDER, L. W. Aromatic Guanyl Hydrazones: Synthesis, Structural Studies and *in vitro* Activity Against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 24, p. 3079-3084, 1995.

MILES, J.M.; LEITER, L.; HOLLANDER, P.; WADDEN, T.; ANDERSON, J.W.; DOYLE, M.; KLEIN, S. Effect of Orlistat in Overweight and Obese Patients With Type 2 Diabetes Treated With Metformin. **Diabetes Care**. v. 25, p. 1123–1128, 2002.

MINGSAN, M.; LILING, X. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. **Advances in Pharmacology**, v. 87. 2020.

MUTOH, M. *et al.* Panclitics, novel pancreatic lipase inhibitors. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**. v. 47, p. 1369-1375, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry. Ed. 6. 2012.

NITIN, A. L. *et al.* Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 897-921, 2014.

NORGINE, Norgine and Takeda announce the new drug application approval of oblean® (cetilistat) tablets 120mg in japan for the treatment of obesity with complications, 2013.

PADWAL, R.S.; MAJUMDAR, S.R. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. **The Lancet**, v. 369, p. 71–77, 2007.

PETERSEN, M.T.N.; FOJAN, P; PETERSEN, S.B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p. 115-147, 2001.

PENG, S. C. *et al.* The antimicrobial activity of heyneanol A extracted from the root of taiwanese wild grape. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 485-491, 2008.

PI-SUNYER, X.; The Medical Risks of Obesity. **Postgraduate Medicine**, n. 20-33, p. 5481, 2015.

PMDA, New Drugs Approved in FY 2013, Disponível em: <https://www.pmda.go.jp/files/000153463>. Acesso em: 17 de maio de 2019. 2013.

PORTER, A.S. *et al.* Abdominal subcutaneous adipose tissue: A protective fat depot? **Diabetes Care**, v. 32, n. 6, p. 75-1068, 2009.

RAJAN L. *et al.* Targeting obesity with plant-derived pancreatic lipase inhibitors: A comprehensive review. **Pharmacological Research**. v. 155, p. 104681, 2020.

RICHWINE, L. US probes Roche, Glaxo diet drug over liver injury. Disponível em: <https://www.reuters.com/article/us-roche-xenical/u-s-probes-roche-glaxo-diet-drug-over-liver-injury-idUSTRE57N4U320090825>. Acesso em: 14 maio de 2019.

RITTER, A. et al. Obesity and COVID-19: Molecular Mechanisms Linking Both Pandemics. **International Journal of molecular Sciences**. v. 21, n. 16, p. 5793, 2020.

ROCHE. Submission for Reclassification of Xenical® (Orlistat capsules 120mg) To Pharmacist Only Medicine for Weight Control in Adults, 2003. Disponível em: <https://medsafe.govt.nz/profs/class/Agendas/agen31-Xenical.pdf>. Acesso em: 12 de maio de 2019.

RÔMULO P. *et al*, Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância Biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

ROSSETO, M.; MCNALLY, J.; HERRY, R. J. Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae TAG. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 61-66. 2002.

RUIZ, R.; AVIADO, M. Pharmacology of new antimalarial drugs—3 guanylhydrazones. **Pharmacology**, v.4, n.1, p.45, 1970.

SANKAR, V.; MAIDA, E. S. E. Synthesis, biological evaluation, molecular docking and in silico ADME studies of phenacyl esters of N-Phthaloyl amino acids as pancreatic lipase inhibitors. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 276–283. 2018.

SEFC, K.M; STEINKELLNER, H.; LEFORT, F; BOTTA, R.; MACHADO, A. C.; BORREGO, J.; MALETIC, E.; GLOSSL, J. Evaluation of the genetic contribution of local wild vines to European grapevine cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 54, p. 15-21, 2003.

SCOTT D. L. *et al*. Synthesis and Biological Activity of Analogues of the Antidiabetic/Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid: Discovery of a Novel Aminoguanidinoacetic Acid Antidiabetic Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1217-1230, 2001.

SIQUEIRA, A. J. S. *et al*. Determination of K_M and V_{Max} : review and a new proposal. v. 13, n. 27, 2011.

SLADIČ G. *et al*. New Lipstatin-Producing *Streptomyces* Strain. **Food Technology Biotechnology**, v. 52, p. 276–284, 2014.

SNOW, V. *et al*. Pharmacologic and Surgical Management of Obesity in Primary Care: A Clinical Practice Guideline from the American College of Physicians. **Clinical Guidelines**. p. 525–532. 2004.

SRIDHAR, S.N.C.; BHURTA, D.; KANTIWAL, D.; GEORGE, G.; MONGA, V.; PAUL, A.T. Design , synthesis , biological evaluation and molecular modelling studies of novel diaryl

substituted pyrazolyl thiazolidinediones as potent pancreatic lipase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 3749–3754, 2017.

SRIDHAR S.N.C.; PALAWAT, S.; PAUL, A.T. Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling studies of indole glyoxylamides as a new class of potential pancreatic lipase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 373–381, 2019.

STALDER, H.; OESTERHELT, G.; BORGSTRÖM, B. Tetrahydrolipstatin: Degradation products produced by human carboxyl-ester lipase. **Chimica Acta**. v. 75, p. 1593–1603, 1992.

STEFAN N. *et al.* Obesity and impaired metabolic health in patients with COVID-19. **Nature Reviews Endocrinology**. 2020.

SUNDBERG, R.J.; DAHLHAUSEN, D.J.; MANIKUMAR, G.; MAVUNKEL, B.; BISWAS, A.; SRINIVASAN, V.; MUSSALLAM, H.A.; REID, W.A.; AGER, A.L. Cationic antiprotozoal drugs—trypanocidal activity of 2-(40- formylphenyl) imidazo[1,2-A]pyridinium guanylhydrazones and related 81 derivatives of quaternary heteroaromatic-compounds. **Journal Medicinal Chemistry**, v.33, n.1, p.298–307, 1990.

TAYLOR P.W.; ARNET I.; FISCHER A.; SIMPSON I.N. Pharmaceutical Quality of Nine Generic Orlistat Products Compared with Xenical®. **Obesity Facts**. v. 3, p. 231–237, 2010.

TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin-b4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin-b-4':4'-diallylthiosemicarbazone. **Antiviral Research**, v.24, p.305, 1994.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica, **Química Nova**, v. 28, v. 6, p.1030-1037, 2005.

THIS, P. *et al.* Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 109, p. 1448-1458, 2004.

ULRICH, P.; CERAMI, A. Trypanocidal 1,3-Arylene Diketone Bis(guanylhydrazones). Structure-Activity Relationships among Substituted and Heterocyclic Analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 35-40, 1984.

UMASHANKER, D.; IGEL, L. I.; ARONNE, L. J. Current and future medical treatment of obesity. **Gastrointest Endoscopy**. v. 27, p. 181-190, 2016.

VALERIE, A. V. Synthesis and Biological Activity of Aminoguanidine and Diaminoguanidine Analogues of the Antidiabetic/Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1231-1248, 2001.

VU, D.; VU, T.; NGUYEN, P.; TRAN, D. Virtual Screening, Oriented-synthesis and Evaluation of Lipase Inhibitory Activity of Benzyl Amino Chalcone Derivatives. **Medicinal Pharmacology Research**, v. 1, p. 26–36, 2018.

WALZER, P. D. *et al.* Guanylhydrazones in Therapy of *Pneumocystis carinii pneumonia* in Immunosuppressed Rats. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.38, n.11, p. 2572-2576, 1994.

WEIBEL E.K.; HADVARY P.; HOCHULI E.; KUPFER E, Lengsfeld H. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**. v. 40, p. 1081–1085, 1987.

WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; Flavonol 3-O-triglycosides from *Actinidia species*. **Phytochemistry**. v. 29, p. 289-292, 1990.

WHO - World Health Organization. **Obesity and overweight**. Disponível em: who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight. Acesso em: 10 de janeiro de 2019.

WILLIAM, O. F.; BIJAN A.; MARC, S. E.; TIMOTHY J. M. Synthesis and Biological Activity of Guanylhydrazones of 2- and 4-Pyridine and 4-Quinoline Carboxaldehydes. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 79, n. 6, 1990.

WONG, E.; KAUR, N.; MA, N.; PATEL, K. Obesity: A Focus on Pharmacotherapy. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 9, n. 6, p. 387–395, 2013.

YAMADA, Y.; KATO, T.; OGINO, H.; ASHINA, S.; KATO, K. Cetilistat (ATL-962), a Novel Pancreatic Lipase Inhibitor, Ameliorates Body Weight Gain and Improves Lipid Profiles in Rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 40, p. 539–543, 2008.

YUDA, N.; TANAKA, M.; SUZUKI, M.; ASANO, Y.; OCHI, H.; IWATSUKI, K. Polyphenols extracted from black tea (*camellia sinensis*) residue by hot-compressed water and their inhibitory effect on pancreatic lipase *in vitro*. **Journal of Food Science**, v. 77, 2012.

ZHU, T.; WANG, L.; WANG, W.; HU, Z.; YU, M.; WANG, K.; CUI, Z. Enhanced production of lipstatin from *Streptomyces toxytricini* by optimizing fermentation conditions and medium. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, p.106–111, 2014.

ZOU, X.; JIANG, X.; WEN, Y.; WU, S.; NADEGE, K.; NINETTE, I.; ZHANG, Hui.; JIN, Q.; WANG, X. Enzymatic synthesis of structured lipids enriched with conjugated linoleic acid and butyric acid: strategy consideration and parameter optimization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. V. 43, n. 2, p. 273-282, 2020.

APÊNDICE - Capítulo de livro sobre os estudos de compostos com potencial interação em diferentes tipos de lipases.

Considerando a atual escassez de medicamentos antiobesidade, esta revisão de literatura propõe uma compilação de diversos grupos químicos e estruturas farmacologicamente conhecidas provenientes de fontes naturais e sintéticas, apresentando estudos biológicos e computacionais de potentes inibidores de lipase. Este trabalho foi publicado no livro *Advances in Medicinal Chemistry* em 2019 (**Figura A**).

Figura A - Proposta de inibidores de lipase para o tratamento da obesidade

In: *Advances in Medicinal Chemistry ...* ISBN: 978-1-53616-368-1
Editor: E. Ferreira da Silva-Júnior © 2019 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 1

**ANTI-OBESITY DRUGS AGAINST
FAT ABSORPTION: CURRENT STATUS AND
FUTURE PROSPECTS OF LIPASE INHIBITORS**

Giovanni Ortiz Leoncini^{1,2,}, PhD,
Nathan Araújo de Melo¹
and João Xavier de Araújo-Júnior^{1,2}, PhD*

¹Pharmaceutical Sciences Institute,
Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

²Institute of Chemistry and Biotechnology,
Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

FONTE: Autor, 2021

ANEXO – Artigo: Avaliação de derivados de AGH como inibidores de lipase para aplicação biotecnológica.

Estudos biotecnológicos com derivados de AGH foram realizados em extratos biológicos de insetos para o controle de pragas. Este trabalho apresenta resultados experimentais e teóricos das interações possíveis na estrutura da lipase *C.rugosa* e da atividade biológica de amostras do inseto para aplicação como inseticida. O artigo foi publicado na revista *Bioorganic Chemistry* em 2018 (**Figura A**).

Figura A - Estudos de AGH como inibidor de lipase *C.rugosa*



FONTE: Autor, 2021