



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA



LUCIANE BARROS SILVA

**PLANEJAMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE A PARTIR DA GALANTAMINA PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**



**MACAPÁ
2019**

LUCIANE BARROS SILVA

**PLANEJAMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE A PARTIR DA GALANTAMINA PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Disciplina de TCC-II da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, no Curso de Licenciatura Plena em Química, como requisito de avaliação de Conclusão do Curso de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos.

Coorientador: Prof. Me. Kelton Luis Belém dos Santos

**MACAPÁ
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 / 1451

- S586 Silva, Luciane Barros.
Planejamento de Novos Inibidores da Enzima Acetilcolinesterase a partir da Galantamina para o Tratamento da Doença de Alzheimer / Luciane Barros Silva. - Macapá, 2019.
1 recurso eletrônico. 70 folhas.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Curso de Química, Macapá, 2019.
Orientador: Cleydson Breno Rodrigues dos Santos.
Coorientador: Kelton Luís Belém dos Santos.
- Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).
1. Doença de Alzheimer. 2. Triagem virtual. 3. Farmacóforo. I. Santos, Cleydson Breno Rodrigues dos, orientador. II. Santos, Kelton Luís Belém dos, coorientador. III. Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

CDD 23. ed. – 540

LUCIANE BARROS SILVA

**PLANEJAMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE A PARTIR DA GALANTAMINA PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

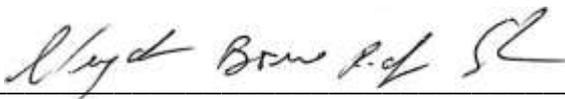
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Disciplina de TCC-II da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, no Curso de Licenciatura em Química, como requisito de avaliação de Conclusão do Curso de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos

Coorientador: Prof. Me. Kelton Luís Belém dos Santos

DATA DE APROVAÇÃO: 13/07/2019

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos
Presidente (ORIENTADOR)
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Prof. Me. Kelton Luís Belém dos Santos
(COORIENTADOR)
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



Prof. Me. Cláudio Pinheiro da Silva Junior
Membro Titular
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Prof. Me. Pedro Henrique Fauro de Araújo
Membro Titular
Instituto Federal do Amapá (IFAP)

MACAPÁ
2019

DEDICATÓRIA

O resultado da dedicação e de esforço aplicados nestes anos de estudos são oferecidos aos meus pais, a minha amada vovó paterna (in memoriam), avó e avô materno, irmãos, aos integrantes da minha família e aos meus amigos de coração.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, por me mostrar que Seus Sonhos para minha vida são maiores do que aquilo que pedi ou imaginei, por me capacitar e inspirar.

Agradeço ao meu professor orientador Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos pelo empenho, dedicação e por ter acreditado que juntos poderíamos ser capazes de elaborar, desenvolver e finalizar vários projetos durante essa jornada de 3 anos na Iniciação Científica, e oferecendo a oportunidade de aprender habilidades essenciais de pesquisa. Seu valioso conselho e ajuda durante este percurso foi uma fonte de inspiração para realizar minha pesquisa com sucesso. Sua capacidade de entender rapidamente a profundidade do problema e sugerir uma solução clara sempre me surpreendeu. Esta monografia não teria sido possível sem suas sugestões criteriosas e críticas, sua participação ativa na construção de modelos certos e um apoio de muito atitude. Eu sempre serei grata a ele por dar direção à minha vida acadêmica.

Desejo expressar meus sinceros agradecimentos ao meu coorientador Prof. Me. Kelton Luis Belém dos Santos pelas suas valiosas sugestões e encorajamento constante, por acreditar em mim em muitas parcerias de extensão, pesquisa e ensino e por me orientar quando estava começando na pesquisa.

Meu profundo sentimento de gratidão ao Laboratório de Modelagem e Química Computacional, LMQC, da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), em especial a Prof. Me. Elenilze Ferreira, Prof. Me. Josiane Viana, Prof. Me. Gláuber Vilhena e Prof. Dr. Ryan Ramos pela orientação e incentivo valiosos.

Em seguida meu agradecimento a todos os professores do colegiado de Química que foram essenciais nessa caminhada rumo à minha tão sonhada formatura, em especial, ao Prof. Me. Claudio Pinheiro por toda a sua humanidade.

A minha fonte de inspiração e referência de vida agradeço imensamente a minha avó paterna Dona Lucilda Pantoja Farias (*in memoriam*) por sempre estar comigo.

Eu devo mais do que a mim mesmo aos meus amados pais Abimael Farias Silva e Ana Dula Pereira Barros, aos meus avós maternos Lúcio Barros e Oflávia

de Nazaré, aos meus amados irmãos Flávia Larissa Barros Silva, Lucilda Barros Silva e Enzo Gabriel Barros Silva por todos esses percurso por me encorajar e animar nos momentos difíceis. Eu também reconheço todos os meus outros membros da família, primos, amigos, colegas e simpatizantes pelo seu apoio constante.

A minha amiga Aline de Santana Carvalho que é uma irmã do coração por sempre me apoiar e por todos esses mais de 10 anos de amizade, obrigada por tudo de coração. Obrigada por me inspirar e pelos valiosos conselhos.

Agradeço aos meus amigos que conquistei nessa jornada, ao Eduardo Ricardo, Harlyson Lopes, Juciele e aos meus colegas de turma 2015/2 por todo esse período de confiança e apoio.

“Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos.”
Friedrich Nietzsche

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma condição neurodegenerativa e irreversível que compromete diversas funções cognitivas, incluindo memória, linguagem e capacidade de autocuidado. Os fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) têm demonstrado eficácia na mitigação dos sintomas da DA, apesar de alguns apresentarem efeitos colaterais colinérgicos, como náusea e vômito, que podem levar à interrupção do tratamento pelos pacientes. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar compostos com atividade inibitória sobre a AChE humana (hAChE) descritos na literatura, identificar a região farmacofórica através de modelagem molecular e, posteriormente, validar este modelo para utilizá-lo na triagem virtual baseada em farmacóforo. A predição do metabolismo, com os metabólitos M3-2, que é formado pela reação de glutationa (Fase II), M1-2 e M2-2 formados pela reação de S-oxidação e hidroxilação alifática (Fase I), foram ambos reativos, mas sem efeitos colaterais. Rotas sintéticas teóricas e previsão de acessibilidade sintética para os compostos mais promissores também são propostas. Em conclusão, a modelagem *in silico* pode ser usada para novos inibidores candidatos a fármacos para hAChE. Os compostos ZINC16951574-LMQC2 e ZINC08342556-LMQC5 são particularmente promissores para administração oral porque têm um perfil favorável de semelhança medicamentosa, excelente solubilidade lipídica, alta biodisponibilidade e farmacocinética adequada.

Palavras-Chave: *Doença de Alzheimer; triagem virtual; farmacóforo.*

Agradecimentos: CNPq, NITT e UNIFAP.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible neurodegenerative condition that compromises several cognitive functions, including memory, language and self-care ability. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors have shown efficacy in mitigating AD symptoms, although some drugs have cholinergic side effects, such as nausea and vomiting, which can lead to discontinuation of treatment by patients. In this context, this study aimed to select compounds with inhibitory activity on human AChE (hAChE) described in the literature, identify the pharmacophoric region through molecular modeling and, subsequently, validate this model for use in virtual pharmacophore-based screening. Metabolism prediction, with metabolites M3-2, which is formed by the glutathione reaction (Phase II), M1-2 and M2-2 formed by the S-oxidation and aliphatic hydroxylation reaction (Phase I), were both reactive, but without side effects. Theoretical synthetic routes and synthetic accessibility prediction for the most promising compounds are also proposed. In conclusion, *in silico* modeling can be used for novel drug candidate inhibitors for hAChE. Compounds ZINC16951574-LMQC2 and ZINC08342556-LMQC5 are particularly promising for oral administration because they have a favorable drug-likeness profile, excellent lipid solubility, high bioavailability, and adequate pharmacokinetics.

Keywords: Alzheimer's disease; virtual screening; pharmacophore.

Acknowledgments: CNPq, NITT and UNIFAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Comparação entre cortes cerebrais de um cérebro de um paciente com um cérebro normal e um com a doença de Alzheimer (DA).....	20
Figura 2- Ilustração de um cérebro normal com o cérebro de paciente de Alzheimer, na qual os emaranhados neurofibrilares intracelulares e as placas β -amiloide extracelulares estão representados.	21
Figura 3- Patogênese do Mal de Alzheimer. Ilustração demonstrando o acúmulo de placas β -amiloide, levando a formação de placas amiloide e emaranhados neurofibrilares.	21
Figura 4- Estrutura dos principais Fármacos atualmente aprovados e disponíveis para tratamento da Doença de Alzheimer	22
Figura 5- Fórmula Estrutural da Acetilcolina	24
Figura 6- Esquema do Mecanismo da enzima acetilcolina.....	24
Figura 7- PDB 4EY6. Em ciano a cadeia lateral A e em cinza a cadeia lateral B, apresentando a Tríade catalítica de Tyr-337, Trp-86A e Glu-202, e as interações de ligações de hidrogênio mais importantes com os outros aminoácidos do ligante (-)-Galantamina da AChE.	26
Figura 8- Tríade catalítica de Tyr-337, Trp-86A e Glu-202, e as interações de ligações de hidrogênio mais importantes com os outros aminoácidos do ligante Galantamina da AChE.....	31
Figura 9- Representação esquemática da metodologia	42
Figura 10- Dendrograma de HCA, correlação entre características farmacofóricas e pIC50.	46
Figura 11- Dendrograma HCA para as 15 moléculas derivadas da GAL com atividade inibidora de <i>hAChE</i> e a Galantamina identificada como o número 1, os clusters estão divididos em: Mais Ativos representado em azul (a) e menos ativos (b) representado em rosa.	47
Figura 12- Modelo de farmacóforo selecionado para triagem virtual. Esfera laranja (Anel Aromático), azul (Hidrofóbico) e rosa (Aceptor de Ligação de Hidrogênio). (a) Hipótese farmacofórica testada em um conjunto de compostos selecionados. (b) Hipótese e análise farmacofórica do sítio ativo: as três características estão em regiões de interações com sete aminoácidos importantes no receptor da <i>hAChE</i>	49

Figura 13- Representação RMSD de ligando cristalografia (verde) e melhor posição de encaixe molecular (vermelho).	56
Figura 14- Representação das interações em 2D (A) e 3D (B) por meio de estudos da técnica de <i>docking molecular</i> para Galantamina	57
Figura 15- Representação das interações em 2D (A) e 3D (B) através de estudos da técnica de <i>docking molecular</i> para LMQC5	57
Figura 16- Representação das interações em 2D (A) e 3D (B) através de estudos da técnica de <i>docking molecular</i> para LMQC5	58
Figura 17- Predição no Metatox da zinc_16951574 (LMQC2) com os metabólitos e suas respectivas reações químicas.	60
Figura 18- Predição no Metatox da zinc_8342556 (LMQC5) com os metabólitos e suas respectivas reações químicas.	61
Figura 19- As enzimas P450 catalisam preferencialmente a hidroxilação	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Afinidade de ligação da Galantamina e dos compostos resultantes da triagem virtual do receptor da enzima acetilcolinesterase humano no Protein Data Bank (PDB) ID 4EY6.	59
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estruturas e valores de IC ₅₀ para derivados de GAL.....	33
Tabela 2- Coordenadas espaciais do modelo farmacofórico	43
Tabela 3- Resultado da matriz com 7 descritores e a Correlação de Pearson das variáveis resultantes das moléculas da triagem virtual em ligante	44
Tabela 4- Parâmetros Físico-Químicos relacionados à Regra dos Cinco para os compostos obtidos por triagem virtual farmacofórica.....	50
Tabela 5- Valores de predições farmacocinéticas: #star, “Ruleof Five”, absorção oral humana, absorção oral humana (%), QPPCaco, QPPMDCK, QPlogPo/w, SNC e QPlogBB para a GAL e compostos obtidos via triagem virtual.....	51
Tabela 6- Previsão da toxicidade por meio da identificação de grupos toxicofóricos dos compostos obtidos via triagem virtual baseado em farmacóforo.....	53
Tabela 7- Predição de atividade biológica dos compostos resultantes da triagem virtual usando o servidor online PASS.	54
Tabela 8- Metabólitos prováveis para o zinc_16951574 (LMQC2), reações químicas e valores da probabilidade de a reação acontecer e DL50.....	61
Tabela 9- Metabólitos prováveis para o zinc_8342556 (LMQC5), reações químicas e valores da probabilidade de a reação acontecer	62
Tabela 10- Propriedades de absorção dos metabólitos dos compostos mais promissores	63
Tabela 11- Distribuição das propriedades de PPB e de penetração da barreira Hematoencefálica para os metabólitos dos compostos mais promissores	64
Tabela 12- Propriedades toxicológicas, cancerígenas e de Mutagenicidade para os metabólitos dos compostos mais promissores	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach - *Acetilcolina*

DA - *Doença de Alzheimer*

Escore - *Pontuação*

FDA - *Food and Drug Administration*

hAChE - *Enzima acetilcolinesterase em humano*

HCA - *análise de agrupamentos por métodos hierárquicos*

IC₅₀ - *Concentração de atividade inibitória*

IUPAC - *União Internacional de Química Pura e Aplicada*

IBGE - *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*

PDB - *Protein Data Bank*

SOMs - *Sítio de Metabolização*

SNC - *Sistema nervoso central*

SNP - *Sistema nervoso periférico*



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	20
2.1.1 Aspectos Históricos.....	20
2.1.2 Tratamento da Doença de Alzheimer	22
2.2 HIPÓTESE COLINÉRGICA	23
2.2.1 Acetilcolina	23
2.2.2 Química da Acetilcolina.....	23
2.2.3 Tratamento Terapêutico para Acetilcolina- Bromidrato de Galantamina (Nome Comercial Razadyne).....	25
2.3 TÉCNICAS DE QUÍMICA MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	25
2.3.1 Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos	25
2.4.2 Triagem Virtual	27
2.4.3 Propriedades Farmacocinéticas	27
2.4.3.1 Absorção / administração	27
2.4.3.2 Distribuição	28
2.4.3.3 Metabolismo	28
2.4.3.4 Excreção / eliminação	28
2.4.4 Propriedades toxicológicas	29
2.4.6 Docking molecular	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 GERAL	32
3.2 ESPECIFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 SELEÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS	33
4.2 SELEÇÃO DO ALVO MOLECULAR.....	34
4.3 DESCRITORES FARMACOFÓRICOS E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA	34
4.3.1 Seleção de Variáveis e Construção de Hipóteses	34
4.3.2 Validação dos Modelos Farmacofóricos	35
4.4 ETAPAS DA TRIAGEM VIRTUAL	35



4.4.1 Geração do Modelo Farmacofórico.....	35
4.4.2 Base de dados – Compostos	36
4.4.3 Triagem Virtual Baseado em Farmacóforo.....	37
4.3 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS.....	38
4.4 PREDIÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	39
4.5 VALIDAÇÃO DO DOCKING MOLECULAR PARA O RECEPTOR DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	40
4.6 ENERGIA E AFINIDADE DE LIGAÇÃO	40
4.7 VISUALIZAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES	40
4.8 PREDIÇÃO METABÓLITA DOS COMPOSTOS MAIS PROMISSORES	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1 CONJUNTO DE DADOS	43
5.2 DESCRITORES FARMACOFÓRICOS E QUIMIOMÉTRICOS.....	43
5.3 QUIMIOMETRIA.....	45
5.4 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM FARMACÓFORO	48
5.5 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS (BIODISPONIBILIDADE ORAL)	49
5.6 PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA	50
5.7 PREDIÇÃO DE TOXICIDADE	52
5.8 PREDIÇÕES DE ATIVIDADE- PASS	53
5.9 DOCKING MOLECULAR.....	55
5.9.1 Predição do metabolismo utilizando o software metatox	59
5.9.2 ADME/Tox	63
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	66
7 REFERÊNCIA	67



1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é, em geral, a forma mais frequente de demência, constituindo doença neurodegenerativa, progressiva, irreversível, e heterogênea em seus aspectos etiológicos e clínicos, apresentando como principais achados neuropatológicos a perda neuronal e a degeneração sináptica, com acúmulo e deposição no córtex cerebral de dois tipos de lesões principais: placas senis (β -amiloide) e emaranhadas neurofibrilares (proteína tau) (PALOP; MUCKE, 2016).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2018), há um expressivo aumento da população brasileira idosa e atualmente há aproximadamente uma pessoa de 60 anos ou mais de idade para cada duas pessoas de menos de 15 anos de idade (AGATONOVIC-KUSTRIN; KETTLE; MORTON, 2018). A partir dos 65 anos, o risco de desenvolvimento da doença duplica a cada cinco anos; sendo assim, uma pessoa de 70 anos tem o dobro de chances de desenvolver Alzheimer em relação a uma de 65 (MUCKE, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que até 2050 o número de casos aumente em até 500% em toda América Latina. Atualmente alguns dos principais fármacos eficazes em diminuir os sintomas desta patologia são: Galantamina (Reminyl®, 1), Rivastigmina (Exelon®, 2), Memantina (Namenda®, 3) e Donepezil (Aricept®, 4), ver Figura 4. Contudo, alguns destes medicamentos possuem colaterais colinérgicos, principalmente náusea e vômito, que levam os pacientes a descontinuarem o tratamento.

Devido à atual necessidade de novos inibidores da enzima acetilcolinesterase em humano (*hAChE*) para o tratamento da doença de Alzheimer, a química medicinal e a modelagem molecular são essenciais para a concepção e descoberta de drogas. Nos últimos anos, a Química Medicinal vem buscando novas alternativas e ferramentas capazes de trazer maior agilidade, segurança e direcionamento mais eficiente no planejamento e prospecção de candidatos a fármacos (DIAS, K. S. T. E. A., 2015).

Segundo Santos e seus colaboradores (2015), a modelagem molecular é uma ferramenta muito importante para a descoberta de medicamentos e otimizar protótipos existentes e desenho racional de candidatos a fármacos. O metabolismo do fármaco pode produzir metabólitos com propriedades farmacológicas e físico-químicas que



diferem consideravelmente das do fármaco original e, conseqüentemente, tem importantes implicações para a segurança e eficácia do medicamento (KIRCHMAIR 2015).

Diante do exposto, a pergunta norteadora é: Quais são os compostos com maior eficácia inibidora da enzima acetilcolinesterase resultantes da triagem virtual para o tratamento da doença de Alzheimer?

Assim justifica-se estudar os compostos com atividade inibidora no receptor da *hAChE* utilizando técnicas da química medicinal computacional para a obtenção de resultados com excelentes previsões e com rapidez sobre compostos potencialmente ativos com ação inibidora, já que o composto conhecido (Galantamina) apresenta atividade satisfatória, porém, possui efeitos colaterais colinérgicos (como por exemplo: náusea e vômito) que levam os pacientes a descontinuarem o tratamento. Neste sentido, a importância na busca de novos fármacos com bons resultados farmacocinéticos e toxicológicos é pertinente diante do resultado mostrado pelo composto Galantamina.

Avanços e disseminação de tecnologias computacionais no campo da pesquisa de drogas atualmente permitem o uso de ferramentas de modelagem molecular e química medicinal computacional para ensinar conceitos importantes de planejamento de drogas para estudantes de química e farmácia (CARVALHO; SILVA; SANTOS, 2018).

Softwares e servidores online são selecionados para compor esse recurso pedagógico, de modo que possa ser facilmente implementado em qualquer instituição equipada com uma conexão com a Internet e com computadores. Partindo da estrutura de fármacos conhecidos para obter novos compostos bioativos e, portanto, é um instrumento pedagógico válido para a formação acadêmica e de futuros profissionais que desejam conhecer e adentrar no campo do desenvolvimento de fármacos (RODRIGUES; F; MANTOANI; EIFLER *et al.*, 2015).



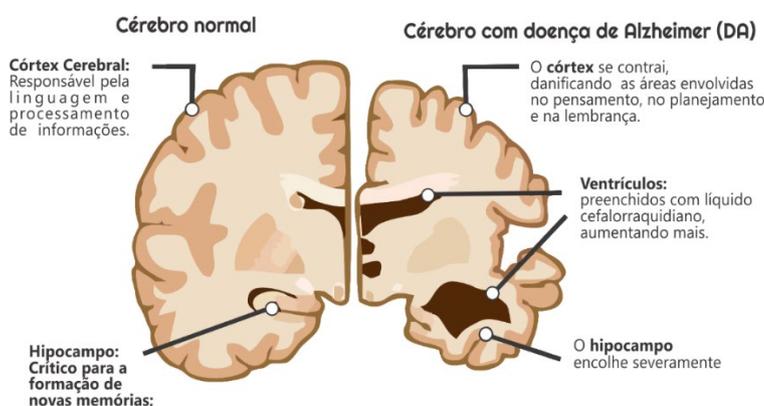
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

2.1.1 Aspectos Históricos

Em novembro de 1901, Alois Alzheimer encontrou seu paciente, Auguste Deter, pela primeira vez. Na época, em sua primeira conversa ele percebe que a mulher de 51 anos apresentara sintomas diferentes de qualquer pessoa que ele já havia visto antes (ALZHEIMER, 1906). A doença de Alzheimer (DA) foi descoberta pelo médico alemão Alois Alzheimer, em 1907, que classificou como uma doença neurológica de causa desconhecida, que envolve déficit de memória, alterações de comportamento e incapacidade para realizar atividades rotineiras (VIEGAS JÚNIOR, 2004). A DA atinge pessoas com mais de 65 anos e causa um grande impacto socioeconômico devido ao alto custo do tratamento e o choque causado ao indivíduo e seus familiares, ver Figura 1 (MUCKE, 2009).

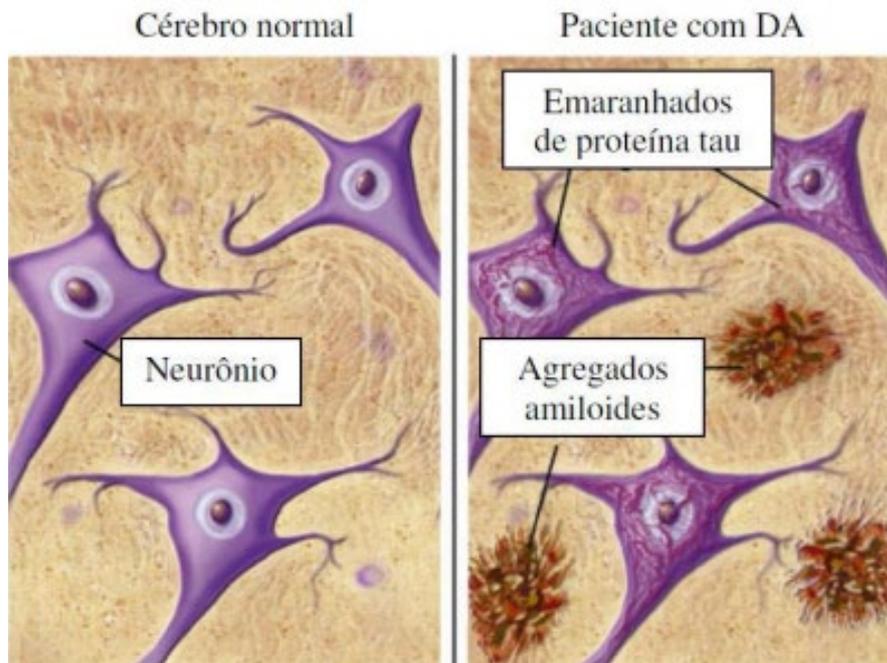
Figura 1- Comparação entre cortes cerebrais de um cérebro de um paciente com um cérebro normal e um com a doença de Alzheimer (DA)



Fonte: Adaptado de Alzheimer's disease Education (2008)

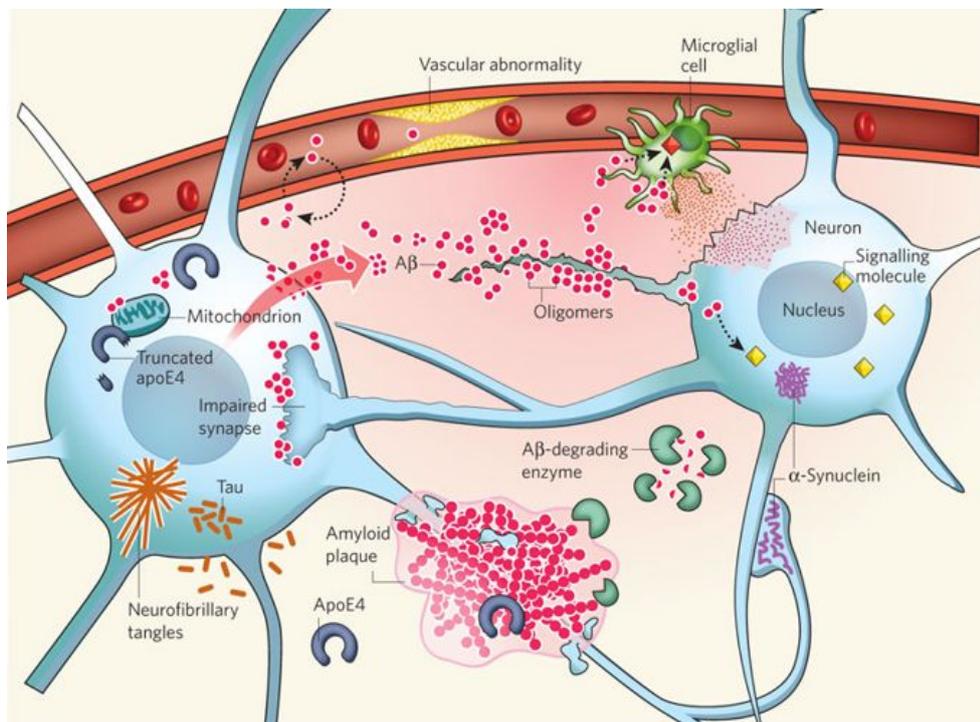
Seidl (2010) afirma que, particularmente, as regiões cerebrais mais afetadas são o neurocórtex e o hipocampo, devido às mudanças bioquímicas associadas à doença. Além disso, quando há a perda das conexões celulares, os neurônios não conseguem funcionar normalmente, isto se dá pelo acúmulo de uma proteína chamada β -amiloide e dos emaranhados neurofibrilares (ver Figura 2 e Figura 3). Com a inevitável morte destas células, ocorre um processo chamado atrofia cerebral e, na fase final da doença, as regiões afetadas já estão plenamente atrofiadas.

Figura 2- Ilustração de um cérebro normal com o cérebro de paciente de Alzheimer, na qual os emaranhados neurofibrilares intracelulares e as placas β -amiloide extracelulares estão representados.



Fonte: Adaptado de MUCKE (2009)

Figura 3- Patogênese do Mal de Alzheimer. Ilustração demonstrando o acúmulo de placas β -amiloide, levando a formação de placas amiloide e emaranhados neurofibrilares.



Fonte: Adaptado de MUCKE (2009)



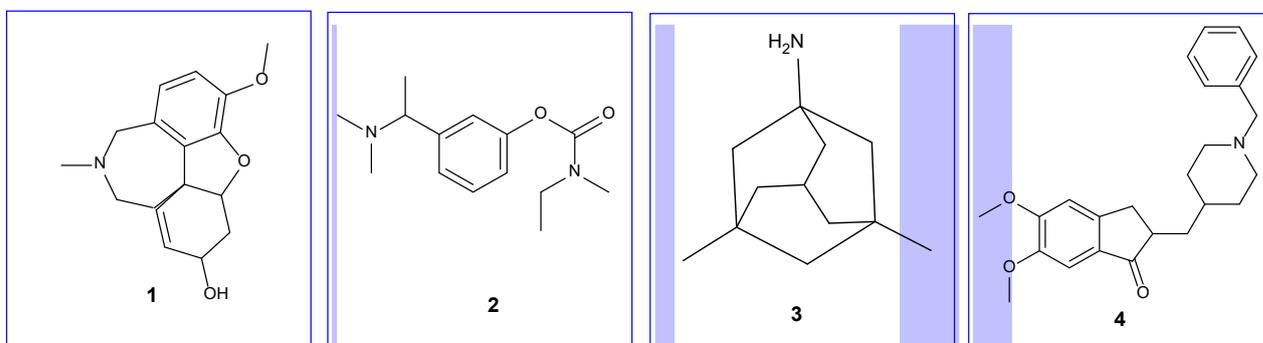
2.1.2 Tratamento da Doença de Alzheimer

Atualmente não há cura para a DA, no entanto, existem vários medicamentos que comprovadamente retardam a progressão da doença e tratam os sintomas. Ao iniciar o tratamento para pacientes com DA, os médicos dividem os sintomas em categorias “cognitivas” e “comportamentais e psiquiátricas”(MUCKE, 2009). Isso permite o tratamento específico dos sintomas que estão sendo experimentados. Os sintomas cognitivos afetam a memória, a linguagem, o julgamento e os processos de pensamento. Os sintomas comportamentais alteram as ações do paciente e emoções(FORSTL; KRUZ, 1999).

O tratamento dos sintomas cognitivos envolve a alteração do efeito de alguns importantes mensageiros químicos no cérebro. Esses mensageiros químicos ajudam a transmitir sinais ao redor do cérebro. Quando há uma falta deles, os sinais não são transmitidos de forma tão eficaz. Esses sintomas ocorrem porque o dano inicial na doença de Alzheimer é geralmente para uma parte do cérebro chamada hipocampo, que tem um papel central na memória no cotidiano(COLLEGE; BETTY, 1998).

Atualmente alguns dos principais fármacos eficazes em diminuir os sintomas desta patologia são: galantamina (Reminyl®, 1), rivastigmina (Exelon®, 2), memantina (Namenda®, 3) e donepezil (Aricept®, 4, ver Figura 4). Estes fármacos são aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) por serem inibidores da colinesterase, o que impede a enzima responsável pela quebra da acetilcolina no cérebro. A acetilcolina é um importante neurotransmissor envolvido no aprendizado e na memória(RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003).

Figura 4- Estrutura dos principais Fármacos atualmente aprovados e disponíveis para tratamento da Doença de Alzheimer



Fonte: Figura desenvolvida utilizando o programa Chems sketch - Autoria Própria



2.2 HIPÓTESE COLINÉRGICA

2.2.1 Acetilcolina

A acetilcolina (Ach) é o neurotransmissor produzido pelos neurônios referidos como neurônios colinérgicos (COLLEGE; BETTY, 1998), ver figura 5. A acetilcolina é um dos neurotransmissores mais importantes e atua como mensageiro para o cérebro.

Esses mensageiros ajudam a transmitir sinais ao redor do cérebro, e quando há uma escassez desses mensageiros, os sinais não são transmitidos tão efetivamente ao cérebro que causa perda de memória e dificuldade de raciocínio etc. A Ach é o neurotransmissor mais abundante, que pode ser encontrado tanto no sistema nervoso periférico (SNP) quanto sistema nervoso central (SNC) (MUCKE, 2009).

No sistema nervoso central, a acetilcolina serve como um transmissor importante nas sinapses do nervo para o nervo no cérebro. Este neurotransmissor foi encontrado por Henry Hallett Dale no ano de 1914 e sua existência foi confirmada por Otto Loewi. É útil pensar em neurotransmissores como mensageiros do cérebro (AJAY; BEMIS; MURCKO, 2000).

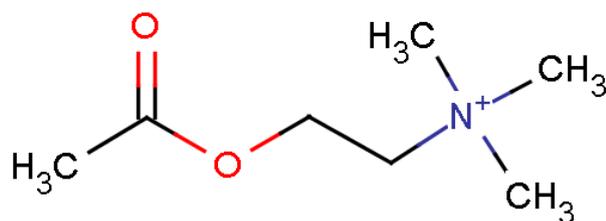
Esses produtos químicos, que se originam no corpo, ajudam a transmitir mensagens de um neurônio para outro neurônio em milissegundos. Basicamente, os neurônios que usam acetilcolina para enviar as mensagens são reconhecidos como neurônios colinérgicos (MÖLLER; GRAEBER, 1998).

2.2.2 Química da Acetilcolina

A acetilcolina é um éster de ácido acético e colina, com a fórmula química $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ e fórmula estrutural mostrada na Figura 5. A acetilcolina foi identificada pela primeira vez em 1914, por Henry Hallett Dale, por suas ações no tecido cardíaco (PATRICK, 2001). Foi confirmado como um neurotransmissor por Otto Loewi, que inicialmente deu o nome de Vagusstoff porque foi liberado do nervo vago. Ambos receberam o Prêmio Nobel de 1936 em fisiologia ou medicina por seu trabalho (MUCKE, 2009).



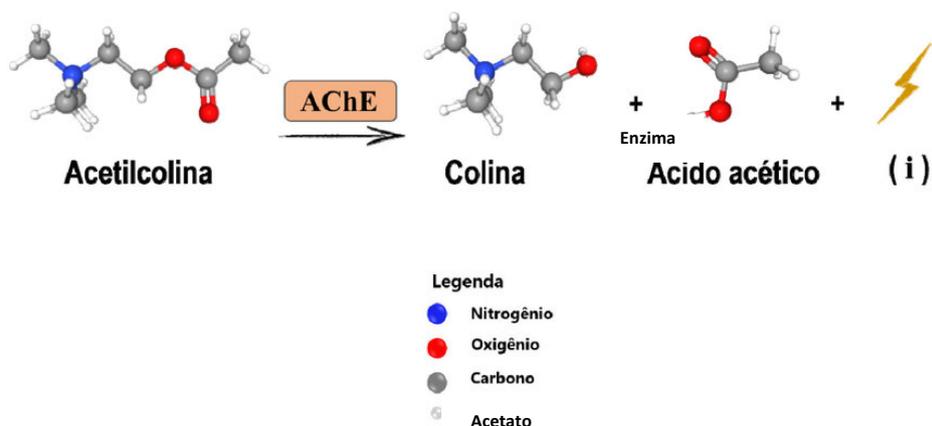
Figura 5- Fórmula Estrutural da Acetilcolina



Fonte: Figura desenvolvida utilizando o programa Chemskech - Autoria Própria

A acetilcolina é sintetizada em certos neurônios pela enzima colina acetiltransferase a partir dos compostos colina e acetil coenzima A (acetil-CoA)(MUCKE, 2009). Compostos mercuriais orgânicos possuem alta afinidade por grupos sulfidril, o que causa disfunção da enzima colina acetiltransferase. Essa inibição pode levar à deficiência de acetilcolina e pode ter consequências na função motora (MÖLLER; GRAEBER, 1998). Normalmente, a enzima acetilcolinesterase converte acetilcolina nos metabolitos inativos colina e acetato (ver Figura 6). Esta enzima é abundante na fenda sináptica, e seu papel na liberação rápida da acetilcolina livre da sinapse é essencial para a função muscular adequada(PATRICK, 2001). É uma enzima rápida que pode rapidamente hidrolisar acetilcolina - 10.000 moléculas de acetilcolina podem ser hidrolisadas em um segundo por uma molécula dessa enzima(MUCKE, 2019).

Figura 6- Esquema do Mecanismo da enzima acetilcolina.



Fonte: Adaptado de Wang (2009)



2.2.3 Tratamento Terapêutico para Acetilcolina- Bromidrato de Galantamina (Nome Comercial Razadyne)

A galantamina (ver Figura 8) é um alcaloide terciário, inibidor seletivo, competitivo e reversível da acetilcolinesterase. É indicada no tratamento de doença de Alzheimer (DA) leve a moderada, bloqueando a hidrólise e aumentando a concentração de acetilcolina. E deve ser administrada duas vezes ao dia, devido a uma curta meia-vida de apenas sete horas(HANSEN, 2008).

Um estudo de pesquisa conduzido por Loy e Schneider (2006) investigou o efeito da galantamina nos sintomas cognitivos em três e seis meses intervalos. Pacientes tomando doses de 18-32 mg/dia mostraram melhorias significativas em ambos os intervalos de tempo(HANSEN, 2008). Os efeitos foram maiores após seis meses de tratamento e foram eficazes em melhorar os escores de avaliação cognitiva dos participantes (MÖLLER; GRAEBER, 1998).

Uma meta-análise de estudos de tratamento de DA por Hansen e um grupo de pesquisadores descobriu que a galantamina é capaz de retardar o declínio da função cognitiva, com efeitos adversos ocorrendo em uma pequena porcentagem de participantes (LANCTOT; HERRMANN, 2009).

2.3 TÉCNICAS DE QUÍMICA MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

2.3.1 Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a química medicinal é definida como uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológica, médica e farmacêutica, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo do metabolismo e interpretação do mecanismo de ação a nível molecular(CARVALHO, 2003).

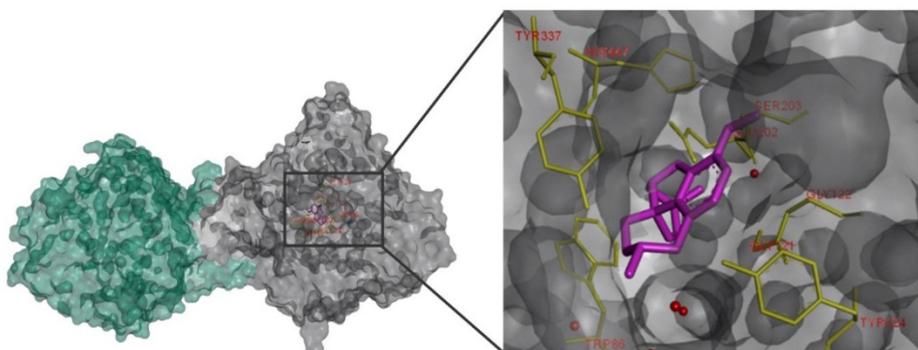
A química medicinal possui métodos eficientes para otimizar a potência e o perfil farmacológico de substâncias, levando ao planejamento e síntese de substâncias cada vez mais ativas, com biodisponibilidade satisfatória, desprovido de toxicidade e metabolismo adequado ao seu emprego terapêutico(WERMUTH, 2003).

Atualmente, existem uma série de complexos da acetilcolinesterase com inibidores disponíveis no Banco de dados de Proteínas (PDB) figura 7, complexo de



código PDB 4EY6, apresentado uma resolução cristalográfica de 2.3983 Å. O modo de ligação da Galantamina pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7- PDB 4EY6. Em ciano a cadeia lateral A e em cinza a cadeia lateral B, apresentando a Tríade catalítica de Tyr-337, Trp-86A e Glu-202, e as interações de ligações de hidrogênio mais importantes com os outros aminoácidos do ligante (-)-Galantamina da AChE.



Fonte: Figura desenvolvida utilizando o programa Acelerys Studio - Autoria Própria.

Na Figura 8 e Figura 7, o sítio catalítico é formado pelo resíduo de Tirosina (TYR-337A), Triptofano (TRP-86A) e Glutamina (GLU-202). A ligação inicial e posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima ocorrem por meio da formação de ligação de hidrogênio entre o oxigênio do anel e os grupos hidroxilas de TYR-337A, TRP-86A, SER-203A E GLY-122A (GIACOBINI, 1999).

O planejamento de fármacos e a descoberta racional de novos agentes terapêuticos, compreende o planejamento estrutural de novos compostos bioativos, buscando a possibilidade de modular um alvo biológico, lançando mão de moléculas orgânicas, objetivando identificar novos padrões moleculares, inéditos e com atividades desejada para efeitos terapêuticos (RODRIGUES et. al., 2015).

Conforme estudos de Lima (2007), os primeiros trabalhos de Química Medicinal datam da década de 70. Porém, os trabalhos brasileiros nesta área são significativos a partir da década de 90, intensificando-se nos anos 2000.

Estratégias de otimização computacionais de medicamentos foram utilizadas para o agente antifúngico Tioconazol R com o objetivo de aumentar a solubilidade e polaridade do medicamento administrado por via tópica, modificações na estrutura química do composto foram inseridas por meio da introdução de substituinte polar (-



OH) e substituição de anéis heterocíclicos (imidazol e tiofeno) por sistemas polares (anel triazol) e deram origem ao fármaco Fluconazol R que apresentou maior solubilidade e atividade contra infecções, administrado por via oral(PATRICK, 2001).

2.4.2 Triagem Virtual

A técnica dominante para a identificação de novos compostos líderes na descoberta de drogas é a triagem virtual de grandes bibliotecas de produtos químicos contra um alvo biológico (triagem de alto rendimento)(DIAS, K. S. T., 2015).

Uma abordagem alternativa, conhecida como triagem virtual hierárquica, é mapear, de maneira computacional, grandes bibliotecas de substâncias químicas para compostos que complementam alvos de estrutura conhecida e testar experimentalmente aqueles que se prevê que se liguem bem(WERMUTH, 2003). Essa triagem virtual baseada em receptor enfrenta vários desafios fundamentais, incluindo a amostragem de várias conformações de moléculas flexíveis e o cálculo de energias de ligação absoluta em um ambiente aquoso.

As técnicas de triagem virtual, são métodos computacionais, que utilizam a busca *in silico* para a seleção de compostos orgânicos promissores como ligantes de alvos terapêuticos desejados; podendo ser agonistas ou antagonistas de receptores, ou inibidores enzimáticos(MONTANARI, 2011).

2.4.3 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

2.4.3.1 absorção / administração

Antes que um composto possa exercer um efeito farmacológico nos tecidos, ele deve ser levado para a corrente sanguínea - geralmente por meio de superfícies mucosas como o trato digestivo (absorção intestinal). A captação nos órgãos ou células-alvo também precisa ser assegurada. Isso pode ser um problema sério em algumas barreiras naturais, como a barreira hematoencefálica (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003).

Fatores como baixa solubilidade dos compostos, instabilidade química no estômago e incapacidade de permear a parede intestinal podem reduzir o grau de absorção do fármaco após a administração oral(CARVALHO, 2003). A absorção determina criticamente a biodisponibilidade do composto. Medicamentos que absorvem mal quando tomados por via oral devem ser administrados de alguma forma menos desejável, como por via intravenosa ou por inalação(SCHRÖDINGER, 2011).



2.4.3.2 Distribuição

Os fármacos ao alcançarem a circulação sanguínea podem se ligar, em diferentes proporções às proteínas plasmáticas. A capacidade de uma droga é afetada pelo grau em que ela se liga a proteínas no plasma sanguíneo (RUDIK, 2017). Quanto menos ligante a droga for, mais eficientemente ela pode transpor as membranas celular ou se difundir (GOEL *et al.*, 2011). O composto precisa ser levado ao seu local efetor, na maioria das vezes por meio da corrente sanguínea. A partir disso, o composto pode se distribuir em tecidos e órgãos, geralmente em diferentes graus (SCHODINGER, 2011).

2.4.3.3 Metabolismo

Os compostos começam a ser quebrados assim que entram no corpo. A maior parte do metabolismo de fármacos de pequenas moléculas é realizada no fígado por enzimas citocromo P450 por meio de reações redox. Como o metabolismo ocorre, o composto inicial (pai) é convertido em novos compostos chamados metabólitos (RUDIK, 2017). Quando os metabólitos são farmacologicamente inertes, o metabolismo desativa a dose administrada do fármaco original e isto reduz geralmente os efeitos no corpo. Os metabólitos podem também ser farmacologicamente ativos, por vezes mais do que o fármaco original (DMITRIEV, 2017).

2.4.3.4 Excreção / Eliminação

Os compostos e seus metabólitos precisam ser removidos do corpo via excreção, geralmente por meio dos rins (urina) ou nas fezes. A menos que a excreção esteja completa, o acúmulo de substâncias estranhas pode afetar adversamente o metabolismo normal (MUSTER, 2015)

Existem três locais onde ocorre a excreção de drogas. O rim é o local mais importante e é onde os produtos são excretados ou a excreção fecal é o processo que inicia no fígado e passa para o intestino até que os produtos sejam finalmente excretados junto com produtos residuais ou fezes. O último método de excreção é por meio dos pulmões (GOEL *et al.*, 2011).



Em geral, a contribuição de intestino, saliva, suor, leite materno e pulmões à excreção é pequena, com exceção à exalação de anestésicos voláteis. O metabolismo hepático muitas vezes aumenta a polaridade e a solubilidade em água do fármaco. Os metabólitos resultantes, assim, são mais prontamente excretados (MUSTER, 2015).

2.4.4 Propriedades toxicológicas

A toxicologia computacional pode ser definida, em termos gerais, como a aplicação de "modelos matemáticos e computacionais para prever efeitos adversos e entender melhor o (s) mecanismo (s)" (IUPAC, 2011). Mais especificamente, o campo pode ser concebido como aquele que emprega "tecnologia computacional e processamento de informação (informática) para analisar, modelar e estimar a toxicidade química com base nas relações de estrutura e atividade (SAR)"(DIAS, K. S. T., 2015).

Atualmente, existe uma ampla gama de abordagens *in silico* que seja empregada para predição de toxicidade. Sistemas especialistas "buscam imitar um especialista humano fazendo previsões"(FOSTER; ROBERTS, 2010). Eles compreendem uma "base de conhecimento", que normalmente codifica o conhecimento generalizado de especialistas humanos como uma coleção de regras e um "mecanismo de inferência" que governa como essas regras são usadas para chegar em previsões para casos específicos (GOMBAR *et al.*, 2007).

É importante notar que esses alertas são capazes apenas de gerar previsões positivas de toxicidade, e a ausência de um alerta não é uma indicação de falta de toxicidade - ao contrário, um alerta relevante para a classe estrutural do composto pode simplesmente não ter sido compilado ainda(DIAS, K. S. T., 2015).

2.4.5 Farmacóforo

De acordo com a IUPAC, o modelo farmacóforo é um conjunto de recursos estéricos e eletrônicos que é necessário para garantir as interações supramoleculares ideais com um alvo ativando (ou bloqueando) a sua resposta biológica (AGATONOVIC-KUSTRIN; KETTLE; MORTON, 2018).

Conforme estudos de Rodrigues (2015) o conceito de farmacóforo foi inicialmente introduzido em 1909 por Ehlich, como uma estrutura molécula (phóros)



que carrega características essenciais, responsáveis pela ação biológica de um fármaco (pharmacón's) e inclui todas as principais características envolvidas na interação do ligante com o sítio receptor.

O farmacóforo engloba características químicas específicas, tais como potencialidade para realização de ligações de hidrogênio, aromáticas e hidrofóbicas, entre outras(YANG, 2010).

O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais das moléculas ligantes em comum, por meio dos quais se define os tipos de interação que fazem com o sítio receptor. A identificação de um farmacóforo pode servir como um modelo importante no desenvolvimento racional de fármacos, uma vez que pode auxiliar na descoberta de novos compostos que pode ligar-se a um receptor alvo(DIAS, K. S. T. E. A., 2015).

2.4.6 DOCKING MOLECULAR

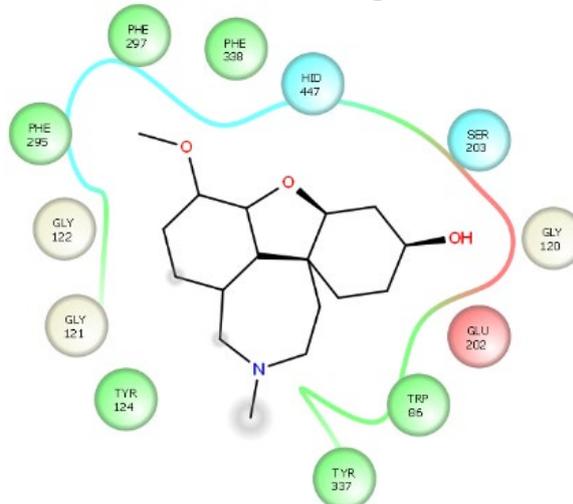
O *docking molecular* é uma técnica computacional *in silico*, utilizado para prever conformação e afinidade de ligação de complexos intermoleculares com base nas estruturas tridimensionais de moléculas individuais (ANITHA *et al.*, 2013).

Este método é amplamente utilizado no campo do planejamento de medicamentos baseado em estrutura, no qual os pesquisadores tentam encontrar compostos, que formarão um complexo intermolecular estável com uma proteína-alvo.

Sabe-se que a proteína-alvo desempenha um papel vital em um processo patológico, de modo que encontrar um inibidor potente é crucial no rompimento de sua função (COSTA *et al.*, 2018). A triagem inicial de possivelmente milhões de compostos em condições laboratoriais é muitas vezes um processo muito caro e demorado para ser viável e, portanto, métodos rápidos de encaixe molecular são usados para eliminar candidatos improváveis.



Figura 8- Tríade catalítica de Tyr-337, Trp-86A e Glu-202, e as interações de ligações de hidrogênio mais importantes com os outros aminoácidos do ligante Galantamina da AChE.



Fonte: Autoria Própria

2.4.7 PREDIÇÃO DO METABOLISMO UTILIZANDO O SOFTWARE METATOX E SMARTCYP

A previsão da estrutura dos metabólitos pode ser realizada por métodos que predizem os sítios de metabolismo (SOMs). Geralmente, este método visa as enzimas da família do citocromo P450, em particular nas isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 (WANG, 2009), uma vez que essas isoformas são responsáveis pelo metabolismo e eliminação da maioria das drogas e a estimativa dos efeitos adversos/colaterais e da toxicidade dos produtos químicos é uma tarefa importante na descoberta de medicamentos (IVANOV; LAGUNIN; POROIKOV, 2016). Os produtos dessas reações devem, portanto, ser conhecidos necessariamente antes que um composto possa entrar em desenvolvimento (SMITH; WATERBEEMD; WALKER, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar compostos potenciais para o tratamento da Doença de Alzheimer no receptor da acetilcolinesterase humana por meio de estudo *in silico*.

3.2 ESPECIFICOS

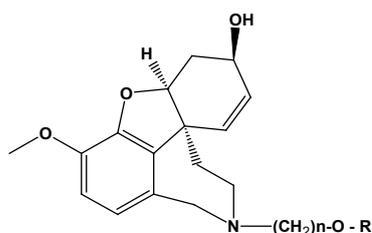
- a) Selecionar compostos com atividade anticolinesterásica descritos na literatura baseados nos valores de IC_{50} (nM);
- b) Predizer o padrão farmacofórico para os compostos selecionados no item (a);
- c) Realizar triagem virtual baseada na hipótese farmacofórica validada;
- d) Predizer as propriedades farmacocinética e toxicológicas dos compostos obtidos via triagem virtual com potencial atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase;
- e) Avaliar a atividade biológica *in silico* dos compostos promissores;
- f) Realizar *docking* molecular para a enzima acetilcolinesterase humana dos compostos selecionados;
- g) Predizer os prováveis sítios de metabolização e metabólitos gerados dos candidatos promissores;
- h) Determinar *in silico* as propriedades toxicológicas e farmacocinéticas dos metabólitos selecionados no item “g”

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS

A seleção das moléculas foi realizada de acordo com os valores de atividade inibitória (IC_{50}) baseado em estudos realizados por Atanasova *et. al.* (2015) como inibidores da acetilcolinesterase em humano (*hAChE*), ver Tabela 1. Além disso, o composto Galantamina ($IC_{50}= 4nM$) foi utilizado como a pivô e o conjunto das 14 estruturas derivadas da Galantamina da série de moléculas mais ativas (5,62 nM a 94,1 nM) e menos ativas (99,1 nM a 306 nM) em função do $IC_{50}(nM)$ para a realização das demais etapas de triagem virtual.

Tabela 1- Estruturas e valores de IC_{50} para derivados de GAL.



No	R	n	IC_{50} , nM	No	R	n	IC_{50} , nM
1		6	5.62	9		12	58.1
2		6		10		10	61.2
3		4	8.86	11		9	88.1
4		4	12.4	12		4	94.1
5		3	14.6	13		4	99.1
6		2	24.5	14		6	113
7		8	34.7	15		6	122
8		4	53.8	16		6	222

As estruturas químicas bidimensionais destes inibidores selecionados foram construídas usando o ChemSketch 12.00 (ACD, 2010), e subsequentemente convertido em 3D e otimizados utilizando o software de Discovery Studio 4.0(BIOVITA FOUNDATION, 2012).

4.2 SELEÇÃO DO ALVO MOLECULAR

Neste trabalho foi realizada a busca do receptor da Enzima acetilcolinesterase na base de dados online Protein Data Bank (PDB - www.pdb.org) para selecionar a forma cristalográfica da Acetilcolinesterase humana (*hAChE*) Complexo com Galantamina (GAL), disponível sob o código 4EY6 tendo resolução de 2.4Å, a fim da realização das etapas posteriores de triagem virtual.

4.3 DESCRITORES FARMACOFÓRICOS E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

O processo para seleção de variáveis objetiva eliminar descritores redundantes para uma relação à atividade biológica. Essa etapa foi realizada via análise estatística por meio da Regressão Linear Múltipla em função do valor de atividade inibitória (variável independente) e outras propriedades farmacofóricas (variável dependente), que apresentarem valores de correlação de Pearson ($p > 0.3$) usando o programa Statistica 7(STATISTICA 2004.), conforme estudos realizados por Santos e seus colaboradores (2015).

O modelo farmacofórico com escore de 32, 692 foi selecionado e validado via análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA) usando os descritores farmacofóricos moleculares obtidos pelo Pharmagist (SCHNEIDMAN-DUHOVNY *et al.*, 2008) por meio do método incremental no programa Pirouette 3.11 (Infometrix, Bothell, WA, EUA), usando as estruturas mais ativas (5,62 nM a 94,1 nM) e menos ativas (99,1 nM a 306 nM) em função do IC_{50} (nM)(ATANASOVA, 2015).

4.3.1 Seleção de Variáveis e Construção de Hipóteses

A área da quimiometria desenvolve ferramentas computacionais que permitem explorar os resultados obtidos por meio de análises químicas, a fim de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química. E, a análise de agrupamento hierárquico (HCA)

atua no sentido de facilitar a interpretação de análises que possuem muitas variáveis, correlacionadas ou não entre si (BIRCK; CAMPOS; MELO, 2016).

4.3.2 Validação dos Modelos Farmacofóricos

A similaridade existente entre as amostras investigadas, utilizando-se de algoritmos para HCA, é verificada de maneira bastante prática, visto que as proximidades entre as amostras são apresentadas em um esquema bidimensional, chamado dendrograma (BIRCK; CAMPOS; MELO, 2016).

De acordo com Ferreira (2015) existem diversas maneiras de se calcular a distância entre dois pontos A e B, d_{AB} . A mais utilizada pelos químicos em estudos quimiométricos é a distância Euclideana, definida conforme a Equação 1, sendo x_{aj} e x_{bj} as '*j-ésimas*' variáveis das amostras A e B, respectivamente, contidas no espaço multidimensional R^J .

$$d_{AB} = \left[\sum_{j=1}^J (x_{aj} - x_{bj})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

4.4 ETAPAS DA TRIAGEM VIRTUAL

4.4.1 Geração do Modelo Farmacofórico

O farmacóforo representa o conjunto de grupos funcionais das moléculas ligantes por meio dos quais se define os tipos de interação que os ligantes em comum fazem com o sítio receptor (ANDRADE, 2014). Para encontrar um modelo que representasse as características comuns essenciais ao conjunto de dados foi realizado um estudo de modelagem farmacofórica baseada em ligante.

Nesta etapa, foi utilizado o servidor *online* PharmaGist (SCHNEIDMAN-DUHOVNY *et al.*, 2008), ao qual gera farmacóforos 3D a partir de um conjunto de moléculas que são conhecidos por se ligarem a um receptor alvo comum (BIRCK; CAMPOS; MELO, 2016), para selecionar os 19 derivados a partir da literatura, a GAL (Galantamina) neste estudo foi escolhida como a molécula pivô (estrutura referência utilizada como parâmetro). O servidor online sobrepõe cada estrutura a pivô e alinha o maior número de características comuns para resultar em diversos farmacóforos com suas determinadas pontuações (score). Os farmacóforos candidatos são detectados por alinhamento múltiplo flexível dos ligantes de entrada, onde a

flexibilidade dos ligantes é tratada de forma expressa e de uma maneira determinista no processo de alinhamento.

Após a análise farmacofórica dos compostos selecionados foi realizado a validação do melhor Modelo farmacofórico gerado via análise estatística por meio da Regressão Linear Múltipla em função do valor de atividade inibitória (variável dependente) e propriedades farmacofóricas (variável independente) que apresentarem valores de correlação de Pearson ($p > 0.3$) usando o programa Statistica 7.0 (STATISTICA, 2004), conforme estudos realizados por Santos e seus colaboradores (2015).

Seguido pelo programa Discovery Studio 4.0 (BIOVITA FOUNDATION, 2012) onde um farmacóforo é definido por suas localizações tridimensionais que são responsáveis pelas semelhantes atividades biológicas de um conjunto de compostos, além de possuírem características essenciais ou subestruturas químicas, além de suas respectivas localizações tridimensionais que são responsáveis pelas semelhantes atividades biológicas de um conjunto de compostos (BIRCK; CAMPOS; MELO, 2016).

Normalmente, as características farmacofóricas são grupos hidrofóbicos, aromáticos, aceitadores de ligação de hidrogênio, doadores de ligação de hidrogênio, ionizáveis positivos e ionizáveis negativos, entre outros. As moléculas do múltiplo alinhamento com maior escore serão utilizadas como "input" (arquivo de entrada) no discovery studio 4.0 para o aperfeiçoamento da geração do modelo farmacofórico que será utilizado para as demais etapas da triagem virtual.

4.4.2 Base de dados – Compostos

Para a descoberta de novos ligantes potenciais, as seguintes bases de dados de compostos químicos serão utilizadas: Zinc_Purchasable e Thiols, Alex_Doemling_UDC, Zinc_Drug Database, Zinc_In_Man, Zinc_Natural_Derivatives, Zinc_Natural_Products e Zinc_FDA_BindingD da base de dados ZincPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu/>).

ZincPharmer (KOES; CAMACHO, 2012) é uma base de dados de compostos comercialmente disponíveis para triagem virtual, possui um banco contendo 176 milhões de conformêros respectivos a 18,3 milhões de compostos; e as moléculas precisam apresentar as mesmas características e coordenadas neste ponto da

molécula. Esta base de dados é atualizada regularmente e pode ser usado gratuitamente no próprio servidor online ou por meio de download, são projetadas para fornecer a maior cobertura do espaço farmacóforo, mantendo a diversidade estrutural. A plataforma foi desenvolvida por John Irving Laboratório Shoichet no Departamento de Produtos Farmacêutico-Químico da Universidade da Califórnia em San Diego(AJAY; BEMIS; MURCKO, 2000), pode ser obtida por meio do servidor online em: <http://www.zinc.org>.

As simulações de triagem virtual são normalmente utilizadas na fase inicial do processo de planejamento e geração do fármaco, a fim de testar um conjunto de compostos com potencial atividade biológica contra o alvo escolhido. De acordo com Dias (2015) a triagem virtual tornou-se uma metodologia importante para preceder os ensaios *in vitro*.

4.4.3 Triagem Virtual Baseado em Farmacóforo

A triagem virtual baseada em farmacóforo foi realizado por meio do servidor ZINCPharmer (KOES, 2012) e “refinado” com o Discovery Studio 4.023 usando as mesmas coordenadas espaciais (x, y, z e R). O programa ZINCPharmer já se utiliza do programa Omega 2.0 da OpenEye Scientific Software (<http://eyesopen.com>) (KIRCHMAIR *et al.*, 2006) para gerar os confôrmeros 3D dos compostos sob análise e possui um banco contendo 176 milhões de confôrmeros respectivos a 18,3 milhões de compostos.

Após essas técnicas, foi realizado a inspeção visual para selecionar apenas os compostos com semelhança farmacofórica e maior similaridade em relação ao ligante pivô ou referência por meio do software Discovery Studio 4.0.

O processo de triagem será realizado utilizando os seguintes filtros:

- a) Número de diferentes orientações de uma mesma conformação (Max hits per Conf): 1;
- b) Número de diferentes orientações de diferentes conformações de uma mesma molécula (Max hits per Mol): 1;
- c) Peso molecular: 200 a 500.
- d) Número de ligações roteáveis na molécula: 1 a 10.

Os compostos selecionados nesta etapa foram determinados as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas.

4.3 Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas

QikProp é um programa de predição de propriedades físico-químicas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). QikProp fornece os resultados das moléculas analisadas, comparando-os com a média dos valores obtidos para 95% dos fármacos conhecidos, os quais são utilizados como referência (SCHODINGER, 2011).

A predição farmacocinética foi realizada no programa QikProp em compostos resultantes da triagem virtual com base baseados nas seguintes propriedades: #star, Regra de linpiskl, absorção intestinal humana, QPPCaco, QPPMDCK, QPlogPo/w, CNS e QPlogBB. QikProp fornece os resultados das moléculas analisadas, comparando-os com a média dos valores obtidos para 95% dos fármacos conhecidos, os quais são utilizados como referência (SCHODINGER, 2011).

Para o caso de uma destas moléculas apresentarem efeitos mutagênicos, carcinogênicos e toxicológicos foram preditos no programa Derek 10.0 ("Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge"), ao qual se baseia na busca por similaridade 2D da molécula em questão ou seus fragmentos com fragmentos de um banco de dados com toxicidade já reconhecida (toxicóforo)(MUSTER, 2015).

O programa Derek 10.0 ("Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge"), baseia-se na busca por similaridade 2D da molécula em questão ou seus fragmentos com fragmentos de um banco de dados com toxicidade já reconhecida (toxicóforo), e correlaciona as estruturas com várias características toxicológicas, tais como mutagenicidade, carcinogenicidade, sensibilização da pele, irritação, efeitos reprodutivos, neurotoxicidade, entre outras(FOSTER; ROBERTS, 2010).

As propriedades ADME/Tox (absorção, Distribuição, metabolismo e excreção / Toxicologia) dos metabólitos foram calculadas utilizando o servidor *online* PreADMET (<http://preadmet.bmdrc.org/>) baseados em estudos realizados por Costa e seus

colaboradores (2018). Este servidor calcula propriedades farmacocinéticas como: Absorção Intestinal Humana (HIA), permeabilidade de células CaCO₂ in vitro (PCaCO₂), a permeabilidade da célula de Maden Darby Canine Kidney (PMDCK), permeabilidade da pele (PSkin), ligação às proteínas plasmáticas (PPB) e a penetração do cérebro sangue de barreira ($C_{\text{Brain}}/C_{\text{Blood}}$), e propriedades toxicológicas tais como: efeitos mutagênicos e carcinogênicos (GOMBAR, *et al.*, 2007).

A ligação às proteínas plasmáticas (PPB), penetração da barreira hematoencefálica (BBB), permeabilidade celular em células CaCO₂ foram preditas pelo servidor online PreADMET para os metabólitos dos compostos com potencial atividade.

4.4 PREDIÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

A predição da atividade dos compostos foi realizada utilizando o programa PASS (<http://www.akosgmbh.de/pass/index.html>), o qual prediz com alta acurácia (70-80%) até 2000 atividades biológicas para compostos químicos. O servidor online PASS (do inglês "Prediction of Activity Spectra for Substances") foi utilizado para prever a atividade do tratamento da doença de Alzheimer, CYP3A4 e CYP2D6 nas moléculas sugeridas como potenciais ligantes da hAChE. Segundo Almeida (2011), a abordagem utilizada no PASS é baseada na sugestão de atividade do composto analisado está intimamente ligado à estrutura. (*Atividade = f(Estrutura)*).

Pass Online estima o espectro de atividade previsto de um composto como probabilidade "de ser ativo" (P_a) e probabilidade "de ser inativo" (P_i). A previsão deste espectro pela PASS é com base na análise SAR do conjunto de treinamento que contém mais de 205.000 compostos que exibem mais de 3750 tipos de produtos biológicos atividades. Sendo probabilidades, os valores de P_a e P_i variam de 0.000 para 1.000 e, em geral, $P_a + P_i \neq 1$, uma vez que estas probabilidades são calculadas de forma independente (POROIKOV *et al.*, 2003).

Apenas atividades com $P_a > P_i$ são consideradas possíveis para um composto particular. Caso, $P_a > 0,7$, a probabilidade de ação farmacológica experimental é alta e se $0,5 < P_a < 0,7$, a probabilidade de ação farmacológica experimental é menor. Se o valor de $P_a < 0,5$, a chance de encontrar a atividade experimentalmente é menor, mas pode indicar uma chance de encontrar um novo composto. (MARWAHA, 2007)

4.5 VALIDAÇÃO DO DOCKING MOLECULAR PARA O RECEPTOR DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A técnica de docking molecular foi realizada utilizando o software AutoDock Vina (ADT) 1.5.6 na interface PyRx, para a orientação dos ligantes de pequenas moléculas candidatas a compostos bioativos aos seus alvos proteicos a fim de prever a afinidade e a atividade da molécula menor. Desta forma, o estudo de docking molecular encarrega-se de determinar as interações entre inibidores e suas respectivas enzimas (BITTENCOURT, *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2018).

A realização das análises das interações dos resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio ativo nos receptores da *hAChE* extraídos do Protein Data Bank (PDB), afinidades de ligação e seletividade, foi utilizado a estrutura dos ligantes complexados em posição fixa e rígida, estabelecendo uma ordem hierárquica em função dos valores das constantes da afinidade de ligação, via o programa AutoDock e o programa PyRx 0.8 (Download livre em <http://pyrx.sourceforge.net/downloads>). (COSTA *et al.*, 2018).

4.6 ENERGIA E AFINIDADE DE LIGAÇÃO

A pose cristalográfica do composto galantamina (PDB 4EY6), assim como as melhores soluções de ancoragem dos compostos promissores dentro do local ativo em relação às suas energias livres de ligação, usando um modelo de solvência implícito baseado em física. (MASSOVA, 1997).

4.7 VISUALIZAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES

O receptor de ancoragem da proteína e os ligantes gerados pelo programa Vina (ADT) 1.5.6 foram salvos no formato .pdb e foram visualizados na ferramenta de visualização Discovery Studio (BIOVITA FOUNDATION, 2012). Destaca-se na visualização tridimensional de proteínas, pequenas moléculas, densidade, superfícies e trajetórias. Inclui também edição molecular, traçado de raios e filmes. Os sítios de ligação do ligando e os aminoácidos circundantes dos ligantes foram também visualizados. Interações moleculares na forma de ligações de hidrogênio entre proteínas e ligantes foram caracterizadas.

4.8 PREDIÇÃO METABÓLITA DOS COMPOSTOS MAIS PROMISSORES

Todas as drogas estão sujeitas ao processo metabólico, em geral, esses processos servem para aumentar a polaridade das moléculas. Para a predição dos melhores compostos será utilizado o servidor online SMARTCyp (<http://www.farma.ku.dk/smartcyp/>) e Metatox (<http://www.way2drug.com/mg/>).

SMARTCyp é um método para prever quais sítios de uma molécula são instáveis para o metabolismo pela isoforma 3A4 do citocromo P450. É também um modelo de reatividade aplicável a todas as isoformas do P450. Segundo RUDIK (2017) WayDrug é um servidor online para predição de sítios de metabolismo e o servidor Metatox pode fazer predições acerca de uma variedade mais ampla de reações, e é capaz de prever os tipos de transformação que podem ocorrer no local do metabolismo e o provável metabolito formado.

O Metatox é uma plataforma virtual que utiliza algoritmos para prever os possíveis sítios de metabolismo de uma molécula. A predição é feita a partir das reações de fase 1 (oxidação, redução e hidroxilação) e 2 (conjugação). Isto é possível devido a probabilidade de que cada metabolito gerado é calculado usando a avaliação combinada para as classes de biotransformação previstas e os átomos reagentes particulares (RUDIK *et al.*, 2017). Além disso, realiza a predição da estimativa da toxicidade dos xenobióticos integrais dos metabolitos gerados e a geração da rede metabólica é realizada usando o banco de dados do fragmento para todas as classes de reação analisadas. (DMITRIEV *et al.*, 2017).

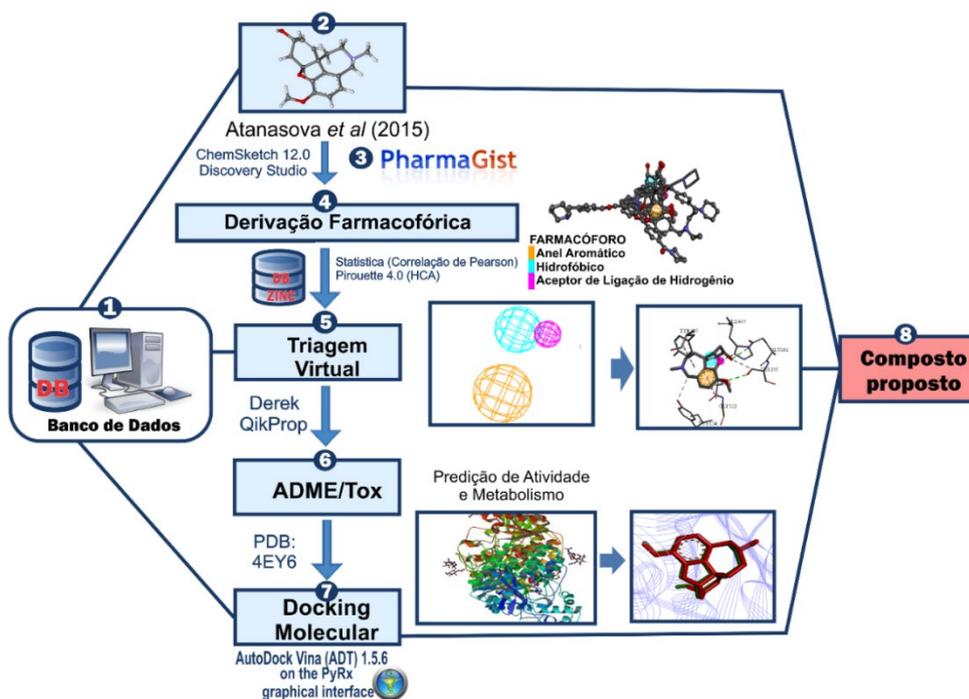
Na aplicação MetaTox, a previsão da modificação do substrato é baseada nas regras de transformação, o primeiro passo é uma previsão da classe de reação para toda a molécula, ao qual baseia-se no algoritmo do software PASS, que usa MNA subestrutura (multinível Bairros dos Átomos) descritores (SADYM *et al.*, 2003) para representação das estruturas moleculares para a construção dos modelos de classificação de SAR. A próxima etapa são dois valores obtidos para cada uma das classes previstas: PR (probabilidade “para ser a reação real”) e PI (probabilidade “para seja a reação impossível”). PR estima a chance de que esta classe prevista de reação ocorrerá no experimento. E PI estima a chance de que esta classe prevista de reação não ocorra no experimento. A probabilidade de geração de metabolito depende das

probabilidades calculadas para o substrato (a partir do qual o metabólito é formado) e sobre os ramos que o conduzem (RUDIK *et al.*, 2017).

A probabilidade do composto parental é igual a um, $P_0 = 1$, e para cada uma das camadas a soma das probabilidades de todos os metabólitos também é igual a um.

Os compostos promissores serão submetidos ao software Metatox, disponível em <http://www.way2drug.com/mg/>, por meio de um desenho bidimensional em uma base de dados de vários milhares de biotransformações xenobióticas observadas em humanos e experimentos baseados em células e tecidos. Inclui as informações sobre 15 classes de reação da Fase I e Fase II do metabolismo de xenobióticos (). Analisamos essas reações para identificar os padrões de diferentes transformações do banco de dados de fragmentos. A metodologia aplicada neste trabalho pode ser vista em um fluxograma na Figura 9.

Figura 9- Fluxograma das Etapas Metodológicas



Fonte: Autoria Própria



5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CONJUNTO DE DADOS

Atanasova *et al.*, (2015) sintetizaram derivados da Galantamina com atividades enzimáticas, disponibilizadas em IC_{50} (concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo, em nM), foram convertidas em $pIC_{50} = (-\text{Log } IC_{50})$.

Os valores de pIC_{50} foram utilizados porque, em estudos de QSAR, é frequente transformar os valores de suas atividades biológicas em suas formas logarítmicas negativas, desta forma os compostos mais ativos apresentam valores mais elevados, pois, geralmente, os dados das atividades biológicas podem apresentar uma grande variação numérica em determinados intervalos. Isso geralmente é resolvido pela transformação de cada valor em seu logaritmo inverso (CRUZ; SERAFIM; DA SILVA; GIULIATTI *et al.*, 2018).

Para a percepção do PharmaGist, as 15 moléculas selecionadas foram utilizadas como entrada, e a Galantamina foi adicionado como pivô, apresentando um score de de 32, 692. O modelo obtido através do PharmaGist foi submetido ao servidor ZINCpharmer, para obter as coordenadas espaciais do farmacóforo. As estruturas alinhadas compartilhavam 3 características farmacofóricas, consulte a Tabela 3, gerando um modelo com as seguintes coordenadas:

Tabela 2- Coordenadas espaciais do modelo farmacofórico

CARACTERÍSTICAS FARMCOFÓRICAS	COORDENADAS			
	X	Y	Z	R
 Aromático	8,2	-59,95	-23,93	1,1
 Hidrofóbico	8,49	-62,48	-25,88	1,0
Aceitador	7,59	-61,43	-22,89	0,5

Fonte: Autoria Própria

5.2 DESCRITORES FARMACOFÓRICOS E QUIMIOMÉTRICOS

As características do farmacóforo (Átomos, Características Espaciais, Aromático, Hidrofóbico, Aceitadores e pIC_{50}) foram utilizadas para a análise do modelo farmacofórico por meio de métodos estatísticos que pudessem comprovar o alinhamento das estruturas. O primeiro método estatístico utilizado foi a correlação de Pearson, que teve como objetivo mostrar a correlação entre as características farmacofóricas e a atividade inibitória das estruturas.

Tabela 3- Resultado da matriz com 7 descritores e a Correlação de Pearson das variáveis resultantes das moléculas da triagem virtual em ligante

Molécula	Átomos	Características	Características Espaciais	Aromático	Hidrofóbico	Aceitadores	pIC_{50}
1	42	12	11	1	6	4	8.25
2	85	17	16	2	9	5	8.06
3	84	18	17	2	10	5	7.91
4	85	17	16	2	9	5	7.82
5	81	16	15	2	8	5	7.75
6	83	17	16	2	8	6	7.62
7	80	17	16	2	8	6	7.46
8	98	22	21	2	13	6	7.26
9	82	17	16	2	8	6	7.24
10	109	25	24	2	17	5	7.22
11	103	23	22	2	15	5	7.06
12	101	23	22	2	14	6	7.03
13	87	18	17	2	8	7	7.01
14	84	17	16	2	7	7	6.94
15	90	19	18	2	9	7	6.93
16	93	20	19	2	10	7	6.66
Características	0,928 0,000						
Características Espaciais	0,928 0,000	1,000					
Aromático	0,806 0,000	0,541 0,030	0,541 0,030				
Hidrofóbico	0,802 0,000	0,944 0,000	0,944 0,000	0,335 0,204			
Aceitadores	0,338 0,201	0,187 0,489	0,187 0,489	0,501 0,048	-0,143 0,597		
pIc_{50}	-0,634 0,008	-0,607 0,013	-0,607 0,013	-0,494 0,052	-0,355 0,178	-0,804 0,000	

Correlação de Pearson
Valor-p

Fonte: Autoria Própria

Juntamente com a correlação de Pearson, o valor de p foi calculado como o valor de significância para o coeficiente, de modo que foi possível avaliar entre as correlações quais valores devem ser considerados na análise, ver Tabela 3.

Para a validação do melhor Modelo farmacofórico gerado pela análise estatística por meio da Regressão Linear Múltipla em função do valor de atividade inibitória (variável dependente) e propriedades farmacofóricas (variável independente) o coeficiente da correlação de Pearson entre as propriedades farmacofóricas e a atividade biológica apresentaram uma correlação proporcional em relação às propriedades selecionadas, em especial ao grupo aceitador de hidrogênio.

Observa-se também nesta tabela que a correlação entre os pares de parâmetros farmacofóricos características é inferior a 0.928, enquanto a correlação entre a atividade inibitória (pIC_{50}) é superior a -0.607, ou seja, apresentando uma correlação inversamente proporcional, em especial ao grupo aceitador de hidrogênio. As características farmacofóricas selecionadas representam as características necessárias para a geração de modelos farmacofóricos na busca de identificar potenciais compostos com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.

5.3 QUIMIOMETRIA

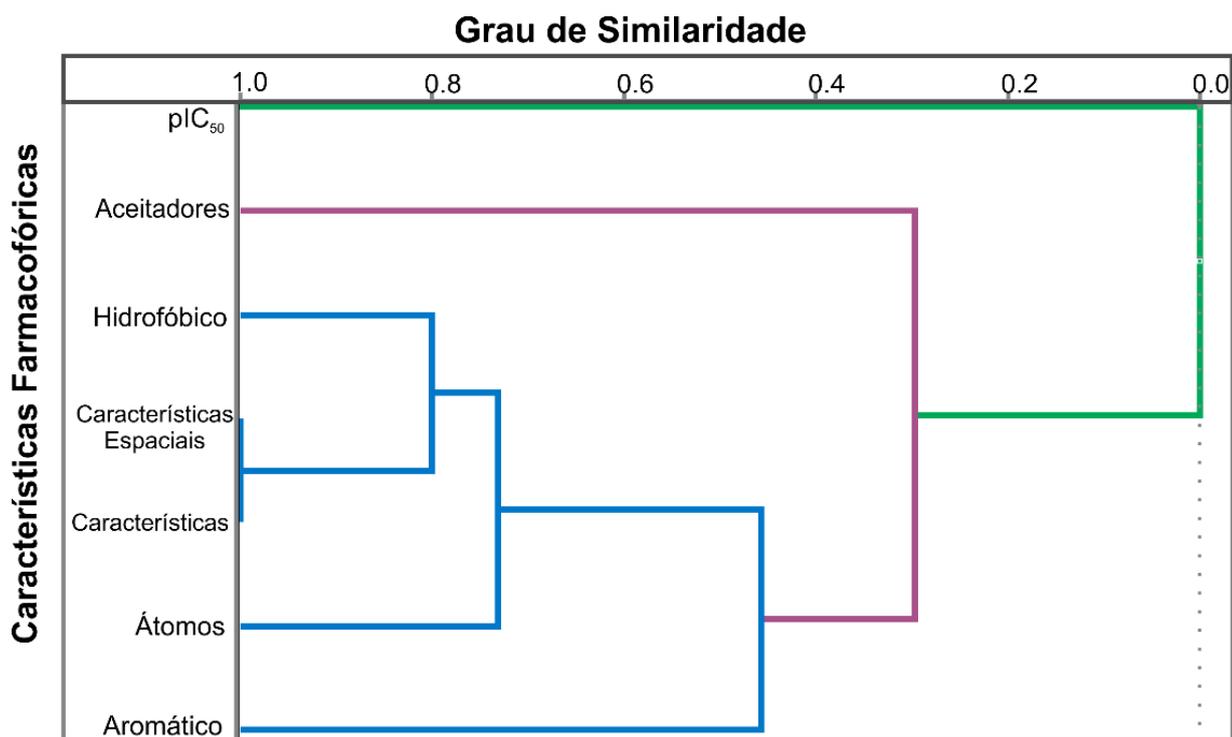
A partir dos descritores obtidos pelo servidor online PharmaGist das moléculas derivadas da Galantamina foi realizado o estudo quimiométrico onde obtendo-se o dendrograma a partir de uma Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA), no programa PIROUETTE 4.0. dos compostos com a atividade biológica (pIC_{50}) como variável dependente e com o cursor de similaridade estrutural em categorias: moderadamente (a), mais (b) e menos ativas (c), originadas a partir de sete descritores moleculares (Átomos, características, características Espaciais, aromático, hidrofóbico e aceitador) para a geração de hipóteses farmacofóricas mostrado na Figura 11 para HCA.

O dendrograma obtido por levar em consideração as características farmacofóricas como variáveis dependentes para o HCA permitiu confirmar as correlações já descritas nas correlações de Pearson entre as características Átomos, características, características Espaciais, aromático, hidrofóbico e aceitador), ver Figura 11.

A técnica HCA mostrado no dendrograma de similaridade classificou as estruturas em duas classes (mais ativas e menos ativas), de acordo com suas

semelhanças, como podemos ver Figura 11. Observa-se que existem semelhanças entre as estruturas, onde é possível identificar dois agrupamentos principais. No maior agrupamento, chamado de mais ativo, estão as estruturas de 1 a 12 com os melhores valores de atividade inibitória, e no menor Cluster, as estruturas de 13 a 16 são as menos ativas, ver Figura 12.

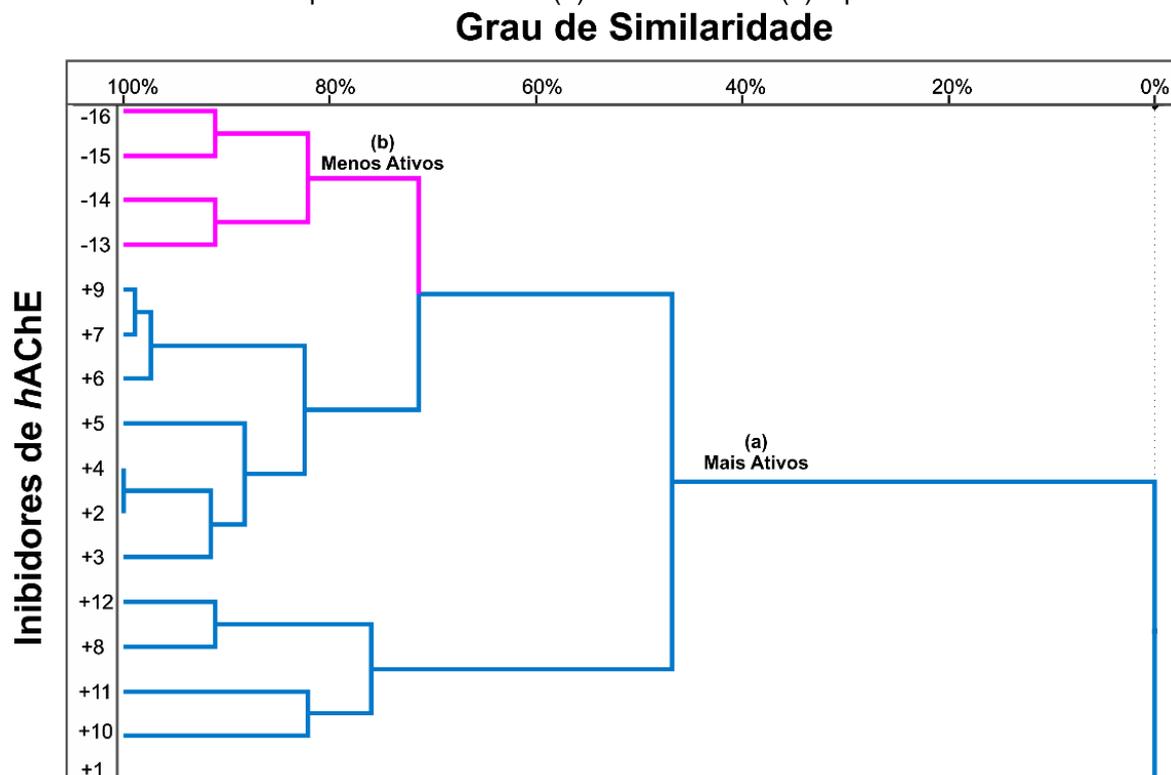
Figura 10- Dendrograma de HCA, correlação entre características farmacofóricas e pIC_{50} .



Fonte: Autoria Própria

Assim, percebe-se rapidamente, pelo dendrograma da Figura 11, que as moléculas 1 e 9 são as mais distintas quando comparadas ao restante das estruturas mais ativas (b). Todavia, as mesmas encontram-se bastante próximas entre si, indicando elevada semelhança química entre elas.

Figura 11- Dendograma HCA para as 15 moléculas derivadas da GAL com atividade inibidora de hAChE e a Galantamina identificada como o número 1, os clusters estão divididos em: Mais Ativos representado em azul (a) e menos ativos (b) representado em rosa.



Fonte: Autoria Própria

É possível observar no grupo das estruturas mais ativas que a similaridade entre as estruturas +10 e +11 está no grupo piperidina o que confirma o valor de atividade na estrutura 10 ($IC_{50} = 58,1 \text{ nM}$) correlacionado com que as estruturas +8 ($IC_{50} = 53,1 \text{ nM}$) e +12 ($IC_{50} = 94,1 \text{ nM}$) estão agrupadas no mesmo cluster, porém, estas apresentam um grupo pirrolidina e morfolina, respectivamente, em função dessa diferença, a atividade na estrutura 14 ($IC_{50} = 113 \text{ nM}$) é o dobro da estrutura 10.

As estruturas +2 e +4 são altamente similares por apresentarem ambas um grupo étamine, a atividade na estrutura +2 ($IC_{50} = 6.52 \text{ nM}$) com o grupo étamine presente é superior a estrutura +4 ($IC_{50} = 14.6 \text{ nM}$). Logo, o grupo étamine e a piperidina possuem mais atividade que o grupo pirrolidina, que por sua vez o grupo morfolina (étamine > piperidina > pirrolidina > morfolina).

5.4 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM FARMACÓFORO

A triagem virtual foi realizada utilizando os modelos de farmacóforo obtidos (Tabela 2) como restrição; as melhores moléculas classificadas em relação as restrições farmacofóricas foram selecionadas/ filtradas para cada um dos quatros modelos obtidos. Após este procedimento, foram obtidas 25 moléculas, onde 20 não são publicados quanto à atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase. E outras 5 moléculas são relatadas na literatura como inibidores da enzima acetilcolinesterase.

O arranjo escolhido abrange características de todas as moléculas. A triagem com o uso de filtros no ZincPharmer resultou em 25 compostos, com características espaciais semelhantes ao farmacóforo. O sucesso para o composto apresentar atividade inibidora da acetilcolinesterase depende da precisão e da especificidade do farmacóforo obtido(KOES; CAMACHO, 2012).

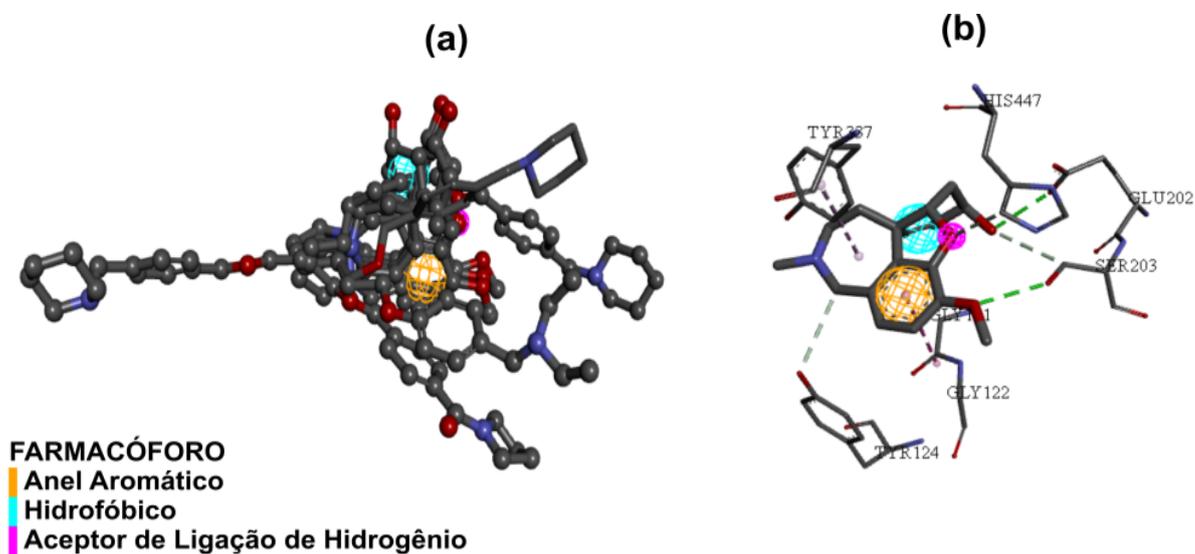
Essa hipótese farmacofórica é formado por conter três características (1 aromático, 2 hidrofóbicos e 2 aceitadores de ligação de hidrogênio) colocados no sítio ativo da enzima com sete resíduos de aminoácidos (HIS-447A, TYR-387A, GLY-122A, SER-203A, GLY-111A, TYR-124A e GLU-202A) cruciais para atividade biológica, ver Figura 12. O arranjo escolhido abrange características de todas as moléculas.

A triagem com o uso de filtros no ZincPharmer resultou em 25 compostos, com características espaciais semelhantes ao farmacóforo. O sucesso para o composto apresentar atividade inibidora da acetilcolinesterase depende da precisão e da especificidade do farmacóforo obtido(ANDRADE, 2014).

Considerando um total de 6 variáveis (características farmacofóricas) por combinação simples, sem repetição e depois de submeter todas as hipóteses a um novo refinamento via servidor ZINC, que apresentou resultados significativos, ver Tabela 4, com 200 compostos selecionados para as etapas posteriores.

As estruturas alinhadas compartilhavam 3 características espaciais, consulte a Tabela 3, gerando um modelo com as seguintes coordenadas:

Figura 12- Modelo de farmacóforo selecionado para triagem virtual. Esfera laranja (Anel Aromático), azul (Hidrofóbico) e rosa (Aceptor de Ligação de Hidrogênio). (a) Hipótese farmacofórica testada em um conjunto de compostos selecionados. (b) Hipótese e análise farmacofórica do sítio ativo: as três características estão em regiões de interações com sete aminoácidos importantes no receptor da *hAChE*.



Fonte: Autoria Própria

5.5 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS (BIODISPONIBILIDADE ORAL)

Estudo de propriedades físico-químicas relacionadas aos parâmetros da Regra do Cinco de Lipinski *et al.*, (1997) foram retirados por meio da plataforma online ZINC (<http://zinc.docking.org/>), para uma análise detalhada, a maioria dos fármacos que apresentam biodisponibilidade oral deve satisfazer três dos seguintes parâmetros:

- Peso molecular menor do que 500 daltons;
- LogP menor do que 5;
- Máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio;
- Máximo de dez grupos aceptores de ligação hidrogênio.

Os dados para avaliação da Regra dos Cinco (RO5) de todas as moléculas selecionadas, podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4- Parâmetros Físico-Químicos relacionados à Regra dos Cinco para os compostos obtidos por triagem virtual farmacofórica

COMPOSTOS	DALTONS	DLH	AIH	LogP	VIOLAÇÕES
Galantamina	287.359	1	4	1,8	0
ZINC86196920	208.257	1	3	2,14	0
ZINC16951574	314.405	2	4	2,07	0
ZINC91960073	253.685	0	4	2,78	0
ZINC00067888	332.49	1	1	4,66	0
ZINC08342556	340.452	0	1	2,98	0
ZINC86199797	222.284	1	3	2,64	0
ZINC13108311	349.226	0	5	3,84	0
ZINC32751241	324.413	0	6	3,02	0
ZINC33313765	332.77	0	6	2,66	0
ZINC91364369	250.685	0	4	2,48	0
ZINC15910267	311.385	0	3	5,07	1
ZINC15910273	357.479	0	3	5,50	1
ZINC16035635	339.439	0	3	5,89	1
ZINC12619062	355.394	0	5	4,86	0

Todas as moléculas obedecem ao critério do peso molecular menor do que 500 daltons, máximo cinco grupos doadores de ligação hidrogênio e máximo 10 grupos aceptores de ligação hidrogênio. Apenas as moléculas ZINC15910273 ZINC16035635 e ZINC12619062 apresentam violação quanto ao LogP.

5.6 PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA

Estudos de propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) são utilizados para análise de compostos terapêuticos, devido a baixas propriedades farmacocinéticas e os compostos constituintes triagem virtual farmacofórica, ver Tabela 5, assim como a pivô (GAL), obtiveram as suas propriedades previstas utilizando o programa QikProp (SCHRODINGER, 2011).

O perfil farmacocinético dos compostos foi avaliado pelo parâmetro #Star com uma pontuação geral de aceitação de farmacocinética para o parâmetro de semelhança de fármaco, que indica descritores de propriedade fora do intervalo de valores otimizados para 95% dos fármacos (MALOLO, 2015). O parâmetro relacionado com a absorção oral humana (AOH) e porcentagem de absorção oral humana (%AOH) demonstraram que todos os compostos apresentam bons resultados, possuindo valores de 3 e 100, respectivamente.

O modelo celular QPPCaco (nm/ sec) e QPPMDCK (nm/ sec) referem-se à previsão de absorção de fármaco por via oral, usada como modelo para a barreira do sangue intestinal. Os resultados QPPCaco mostraram valores maiores que 1838.444, indicando excelentes resultados que prevêm boa absorção intestinal.

O número de violações da regra de Regra do Cinco de Lipinski, conforme o parâmetro no máximo maiores que 4, apenas cinco compostos mostraram valores iguais a um, e, os demais iguais a zero.

Tabela 5- Valores de predições farmacocinéticas: #star, “Ruleof Five”, absorção oral humana, absorção oral humana (%), QPPCaco, QPPMDCK, QPlogPo/w, SNC e QPlogBB para a GAL e compostos obtidos via triagem virtual

TRIAGEM	COMPOSTO	#STAR	RO5	AOH	%AOH	QPPCaco	QPPMDCK	QPlogPo/w	SNC	QPlogBB
FARMACÓFORO	ZINC86196920	0	0	3	100	4677.623	2621.609	2.786	1	0.105
	ZINC16951574	0	0	3	100	1838.444	1056.986	3.174	2	0.611
	ZINC91960073	0	0	3	100	5925.536	7466.586	2.815	1	0.410
	ZINC00067888	0	0	3	100	5134.271	4846.351	4.720	1	0.264
	ZINC08342556	0	0	3	100	2928.309	2764.505	3.828	1	0.144
	ZINC86199797	0	0	3	100	4673.581	4673.581	3.166	1	0.029
	ZINC13108311	0	0	3	100	2387.068	5990.536	3.254	1	0.081
	ZINC32751241	0	0	3	100	2612.621	2463.966	3.884	1	0.114
	ZINC33313765	0	0	3	100	3045.209	4709.309	3.921	1	0.112
	ZINC91364369	0	0	3	100	3953.993	4370.126	2.495	1	0.163
	ZINC15910267	0	1	3	100	7909.027	10000.000	5.067	1	0.396
	ZINC15910273	0	1	3	100	7632.562	10000.000	5.586	1	0.424
	ZINC16035635	0	1	3	100	8414.974	10000.000	5.496	1	0.425
	ZINC12619062	0	0	3	100	7634.828	10000.000	4.467	1	0.385
	ZINC12564247	0	0	3	100	7602.362	10000.000	4.982	2	0.510
	ZINC12623774	0	1	3	100	7802.686	10000.000	5.149	1	0.436
	ZINC12649929	0	0	3	100	5072.856	6896.443	4.497	1	0.153
	ZINC15910328	0	1	3	100	8419.287	10000.000	5.493	1	0.425
	ZINC06435339	0	0	3	100	6862.909	9532.843	4.426	1	0.338
	ZINC13362890	0	0	3	100	3705.456	2037.983	2.415	1	0.111
	ZINC21657754	0	0	3	100	3792.205	2089.602	2.136	1	0.065
	ZINC06817501	0	0	3	100	3639.430	4322.150	2.475	1	0.271
	ZINC15910452	0	0	3	100	5052.730	6826.515	4.462	1	0.134
	ZINC13995355	0	0	3	100	2886.748	4090.784	4.966	1	0.113
	ZINC13995366	0	0	3	100	2618.396	3288.807	4.762	1	0.050

Fonte: Autoria Própria

Alguns estudos sobre a doença de Alzheimer têm mostrado que certas substâncias neuroativas são capazes de atingir concentrações superiores no sistema nervoso central quando comparadas às formas livres, mais abundante na barreira hematoencefálica(SANTOS *et al.*, 2015).

A permeabilidade celular da barreira hematoencefálica imitava células MDCK (QPPMDCK), todos os compostos apresentaram bons resultados dentro dos parâmetros necessários sendo maior que 500 nm/sec (CUNHA *et al.* 2015).

Para os resultados obtidos pelo parâmetro de QPlogBB devem possuir valores menores que 1 e para QPlogPo/w (partição de sangue e cérebro) devem possuir valores menores que 5, respectivamente, logo, os resultados de QPlogBB para os compostos selecionados apresentaram valores menores que 0.611, e, para QPlogPo/w mostraram valores menores que 4.720, ambos com boa previsão dos compostos (ver Tabela 5).

5.7 PREDIÇÃO DE TOXICIDADE

O programa DEREK é utilizado para prever carcinogenicidade, mutagenicidade e sensibilização da pele, indica também a probabilidade de um composto possuir efeitos tóxicos, como a classificação em seis a categorias: a saber, certo, provável, plausível, implausível, improvável ou impossível (DEARDEN, J. C., *et al.*, 1997).

Na tabela 6 é mostrado os resultados das predições toxicológicas para os 25 compostos selecionados por triagem virtual. Com base no efeito tóxico da previsão dos compostos selecionados apenas o ZINC91960073, ZINC00067888, ZINC13108311, ZINC15910267, ZINC15910273, ZINC16035635, ZINC12619062, ZINC12564247, ZINC12623774, ZINC12649929, ZINC15910328 e ZINC06435339 apresentaram efeitos tóxicos.

Tabela 6- Previsão da toxicidade por meio da identificação de grupos toxicofóricos dos compostos obtidos via triagem virtual baseado em farmacóforo.

Compostos	Alerta de Previsão toxicidade (LhasaPrediction)	Grupo Toxicofórico	Alerta de toxicidade
ZINC86196920	-	-	-
ZINC16951574	-	-	-
	Carcinogenicidade Dano cromossômico Irritação (do olho)	Agente alquilante	
ZINC91960073	Irritação (do trato respiratório) Irritação (da pele)	Haleto de benzilo	PLAUSÍVEL
	Sensibilização da pele em humanos	Haloalcano	
ZINC00067888	Sensibilização na Pele	Precursor de catecolo	PLAUSÍVEL
ZINC08342556	-	-	-
ZINC86199797	-	-	-
ZINC13108311	Sensibilização na Pele	Agente de troca tiol ou tiol	PLAUSÍVEL
ZINC32751241	-	-	-
ZINC33313765	-	-	-
ZINC91364369	-	-	-
ZINC15910267	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	PLAUSÍVEL
ZINC15910273	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	PLAUSÍVEL
ZINC16035635	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	PLAUSÍVEL
ZINC12619062	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	PLAUSÍVEL
ZINC12564247	Hepatotoxicidade	Tiofeno	PLAUSÍVEL
	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	
ZINC12623774	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	PLAUSÍVEL
	Sensibilização na Pele	Fenol ou precursor substituído	PLAUSÍVEL
ZINC12649929		Hidrazina ou precursor	
ZINC15910328	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	PLAUSÍVEL
ZINC06435339	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	PLAUSÍVEL
ZINC13362890	-	-	-
ZINC21657754	-	-	-
ZINC06817501	-	-	-
ZINC15910452	Sensibilização na Pele	Hidrazina ou precursor	PLAUSÍVEL
ZINC13995355	-	-	-
ZINC13995366	-	-	-

Fonte: Autoria Própria

5.8 PREDIÇÕES DE ATIVIDADE- PASS

A predição realizada pelo servidor on-line PASS dos compostos oriundos da triagem virtual, dos 25 compostos, 5 (ZINC86196920, ZINC16951574, ZINC86199797, ZINC13362890 e ZINC21657754) apresentaram as seguintes atividades, ver Tabela 7.

Tabela 7- Predição de atividade biológica dos compostos resultantes da triagem virtual usando o servidor online PASS.

COMPOSTO	PA	PI	ATIVIDADE
GALANTAMINA	0,957	0,003	CYP2D6 substrato
	0,553	0,052	CYP3A4 substrato
	0,428	0,055	Tratamento da doença de Alzheimer
	0,31	0,094	CYP3A4 indutor
ZINC86196920	0,408	0,056	CYP2D6 substrato
	0,413	0,085	CYP3A4 substrato
	0,223	0,124	Tratamento da doença de Alzheimer
ZINC16951574	0,553	0,024	CYP2D6 substrato
	0,264	0,187	CYP3A4 substrato
ZINC08342556	-	-	-
ZINC86199797	0,544	0,025	CYP2D6 substrato
	0,532	0,055	CYP3A4 substrato
ZINC32751241	-	-	-
ZINC33313765	-	-	-
ZINC91364369	-	-	-
ZINC13362890	0,191	0,165	Tratamento da doença de Alzheimer
ZINC21657754	0,192	0,164	Tratamento da doença de Alzheimer
ZINC06817501	-	-	-
ZINC13995355	-	-	-
ZINC13995366	-	-	-

Fonte: Autoria Própria

Os valores de Pa e Pi variam de 0.000 para 1.000 indicando as probabilidades do composto para que seja ativo ou inativo, respectivamente (AMMAR, 2017). Nossos resultados revelaram que a Galantamina apresentou atividade para substrato CYP2D6 (Pa= 0,957) e CYP3A4 (Pa= 0,553), tratamento da doença de Alzheimer (Pa= 0,428) e indutor CYP3A4 (Pa=0,31), ratificando os resultados *in silico* neste trabalho.

A acetilcolinesterase possui baixa farmacocinética em suas interações. Contudo, considerando que a galantamina é metabolizada no fígado por meio de CYP2D6 e CYP3A4, seu metabolismo hepático pode ser afetado por substratos específicos, inibidores ou potenciadores das mesmas enzimas (PASQUALETTI, 2015).

5.9 DOCKING MOLECULAR

A conclusão feita a partir dos estudos da técnica de *docking molecular* seguido por cálculos de energia e afinidade de ligação com uma análise detalhada para o complexo da enzima *hAChE* em humano com o Ligante revelaram um padrão de ligação ao da Galantamina com relação aos compostos obtidos da triagem virtual. Estes se ligam no fundo do sítio ativo, abrangendo a ligação importantes e faz contatos com resíduos de sítio aniônico periférico também. Além destes, o grupo hidroxila dos compostos ZINC_16951574 (LMQC2) e ZINC_08342556 (LMQC5) estão atuando como uma âncora para manter os compostos em suas posições atuais por meio de uma série de pontes de hidrogênio com o grupo de nitrogênios do anel. Um clássico π - π interação de empilhamento também foi observada entre o anel fenílico dos compostos.

Estudos de *docking molecular* também mostraram que os compostos ZINC_16951574 (LMQC2) e ZINC_08342556 (LMQC5) foram inibidores mais potentes do que outros compostos com afinidade de ligação de -9,2 e -10,0 Kcal / mol, respectivamente.

Esses compostos exibem interações de van der Waals e interações hidrofóbicas são também encontrados para estabilizar as interações. O resíduo como TRP-86A, GLU-202A e TYR-337A parecem estar envolvidos no processo de interações hidrofóbicas. Considerando que, no caso da Galantamina, as interações são favorecidas principalmente pelo empilhamento formado contra GLU-202A, na ligação de Hidrogênio com átomo de Nitrogênio da cadeia principal do composto ZINC_16951574 (LMQC2), ver figura 14.

Essas interações podem estar contribuindo parcialmente para a maior potência inibitória dos compostos em relação à Galantamina. Nesse sentido, o perfil de interação dos compostos foi analisado com Autodock Vina (ADT) 1.5.6 via interface

PyRx, que constrói o espaço de busca no sítio ativo por uma grade com coordenadas ($x = 8.817$; $y = -60.624$; $z = -23.964$) e tamanho ($x = 18.522$; $y = 23.934$; $z = 11.629$) previamente medido.

O alvo utilizado foi retirado do Protein Data Bank (PDB) devido apresentar pose bioativa no sítio da Acetilcolinesterase em humano (hAChE) em Complexo com a Galantamina, disponível sob o código 4EY6 para prever a afinidade de ligação entre os complexos proteína-ligante. A enzima-alvo possui 539 resíduos de aminoácidos no seu alinhamento de sequências.

A precisão do estudo de *docking molecular* foi validada acoplando a enzima com o ligante cristalizado no sítio ativo, e o desvio quadrático médio (RMSD) sugere que os parâmetros padrão de busca e pontuação foram suficientes para fornecer o modo de afinidade e inibição dos compostos obtidos via triagem virtual (RMSD = 0,07 Å, figura 13). Segundo Cruz e colaboradores (2018), o modo de ligação previsto usando *docking molecular* indica que quando o RMSD é menor que 2,0 Å em relação à pose cristalográfica de um respectivo ligante, a validação é considerada satisfatória.

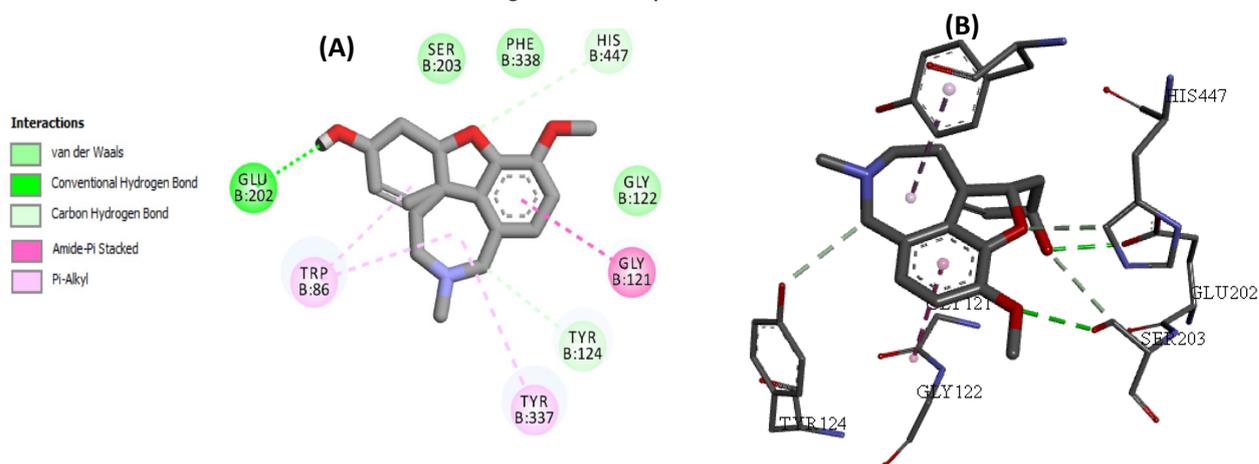
Figura 13- Representação RMSD de ligando cristalografia (verde) e melhor posição de encaixe molecular (vermelho).



Fonte: Autoria Própria

O composto ZINC_16951574 (LMQC2), possui energia de ligação = -11,27 kcal / mol; figura 15), com interações com interações de van der Waals com GLY-121A, interação de empilhamento π com PHE-338, enquanto TYR-337 com interação π – alquila com TYR-449A, também interação de π – Cation com GLU-202A e TRP-86A.

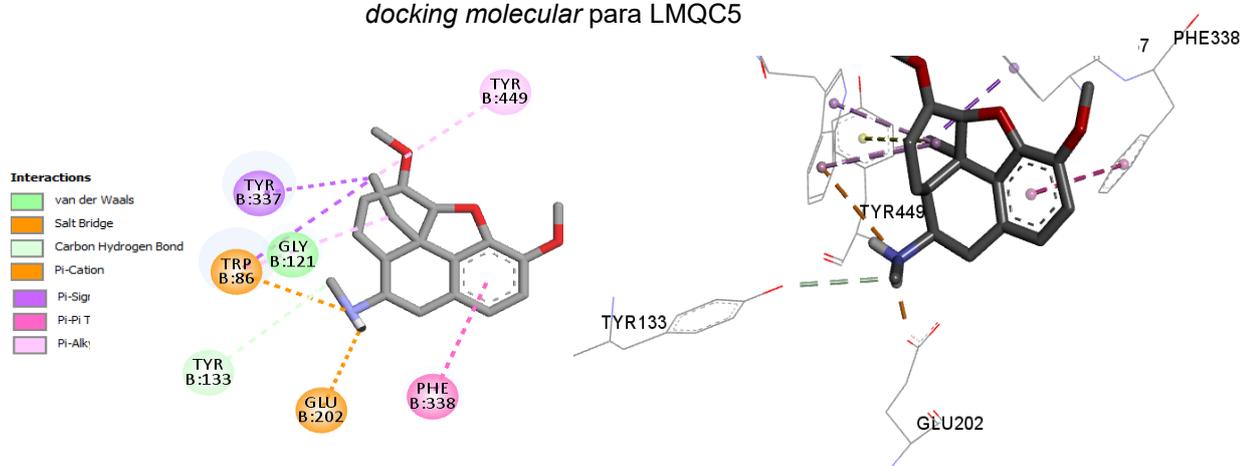
Figura 14- Representação das interações em 2D (A) e 3D (B) por meio de estudos da técnica de *docking molecular* para Galantamina



Fonte: Autoria Própria

O resíduo como o composto ZINC_16951574 (LMQC2), possui energia de ligação = -11,27 kcal / mol; figura 15) com interações de ponte salina do tipo ligação eletrostática de Oxigênio com o grupo NH_2 do ligante com o oxigênio do aminoácido GLU-202A. A interação entre o OH do aminoácido TYR-133 e o Carbono do ligante, evidenciando que é uma ligação de Hidrogênio, o Carbono é o doador e o OH do aminoácido é aceitador, ver Figura 15.

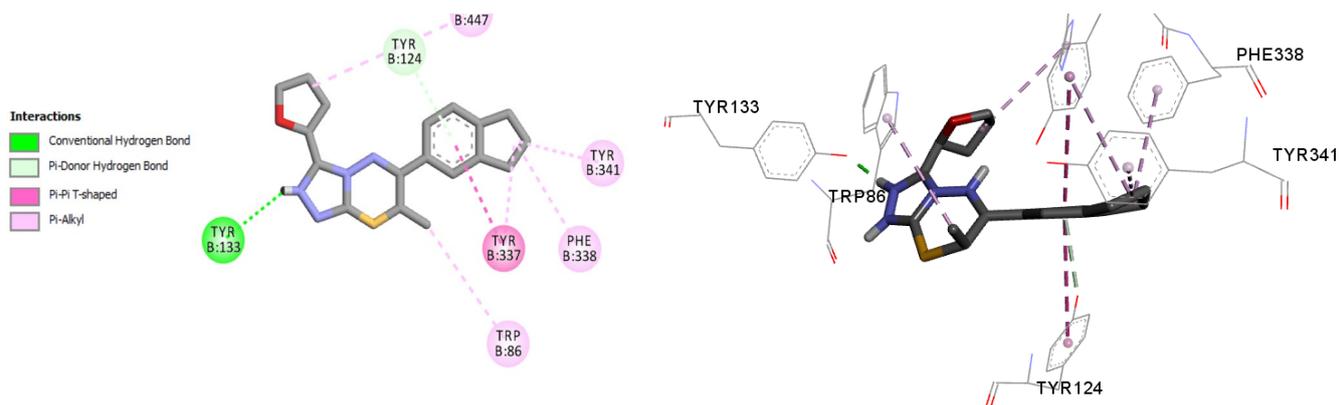
Figura 15- Representação das interações em 2D (A) e 3D (B) através de estudos da técnica de *docking molecular* para LMQC5



Fonte: Autoria Propria

O resíduo como o composto ZINC_16951574 (LMQC5), possui energia de ligação = -11,29 kcal / mol; figura 16) com interações de empilhamento π com TYR-133A, enquanto TYR 337A com interação π - π e PHE-338A, TYR-341A e HIS-447A fizeram interações hidrófobas π -alquila, ver Figura 16.

Figura 16- Representação das interações em 2D (A) e 3D (B) através de estudos da técnica de *docking molecular* para LMQC5



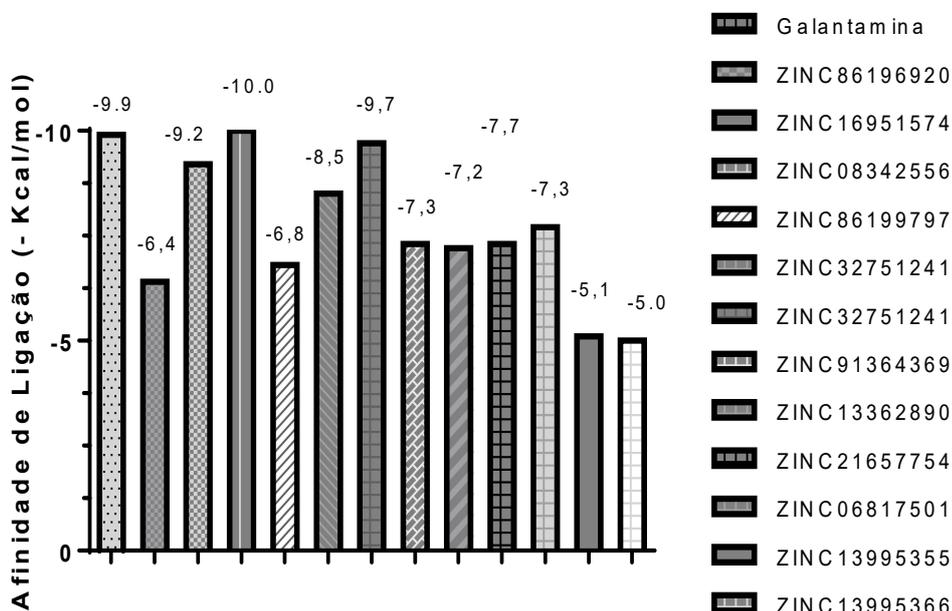
Fonte: Autoria Própria

O gráfico 1 mostra a afinidade de ligação para os compostos resultantes da triagem virtual no sítio ativo de 4EY6, que foram determinadas nas melhores posições e têm a afinidade de ligação mais negativa, indicando uma ligação mais forte (COSTA, *et al.*, 2018), com base nos valores de ΔG . Consequentemente, a interação entre o receptor e os ligantes do sítio ativo é mais significativa.

No sítio ativo humano da enzima acetilcolinesterase, o composto Galantamina foi utilizado como controle, uma vez que os outros compostos aqui estudados apresentam melhores valores de afinidade de ligação e energia livre em comparação a Galantamina, que apresentou um valor de afinidade de ligação de -9,9 kcal / mol.

Estes valores mostram a semelhança obtida na sequência de resíduos de aminoácidos em que o composto zinc_16951574 (LMQC2) apresentou um valor de afinidade de ligação elevada de -9,2 kcal / mol, seguido de zinc_8342556 (LMQC5) com -10,0 kcal / mol, com uma variação de $\pm 0,7$, e $\pm 0,1$ kcal / mol, respectivamente (ver Gráfico 1).

Gráfico 1- Afinidade de ligação da Galantamina e dos compostos resultantes da triagem virtual do receptor da enzima acetilcolinesterase humano no Protein Data Bank (PDB) ID 4EY6.



Fonte: Autoria Própria

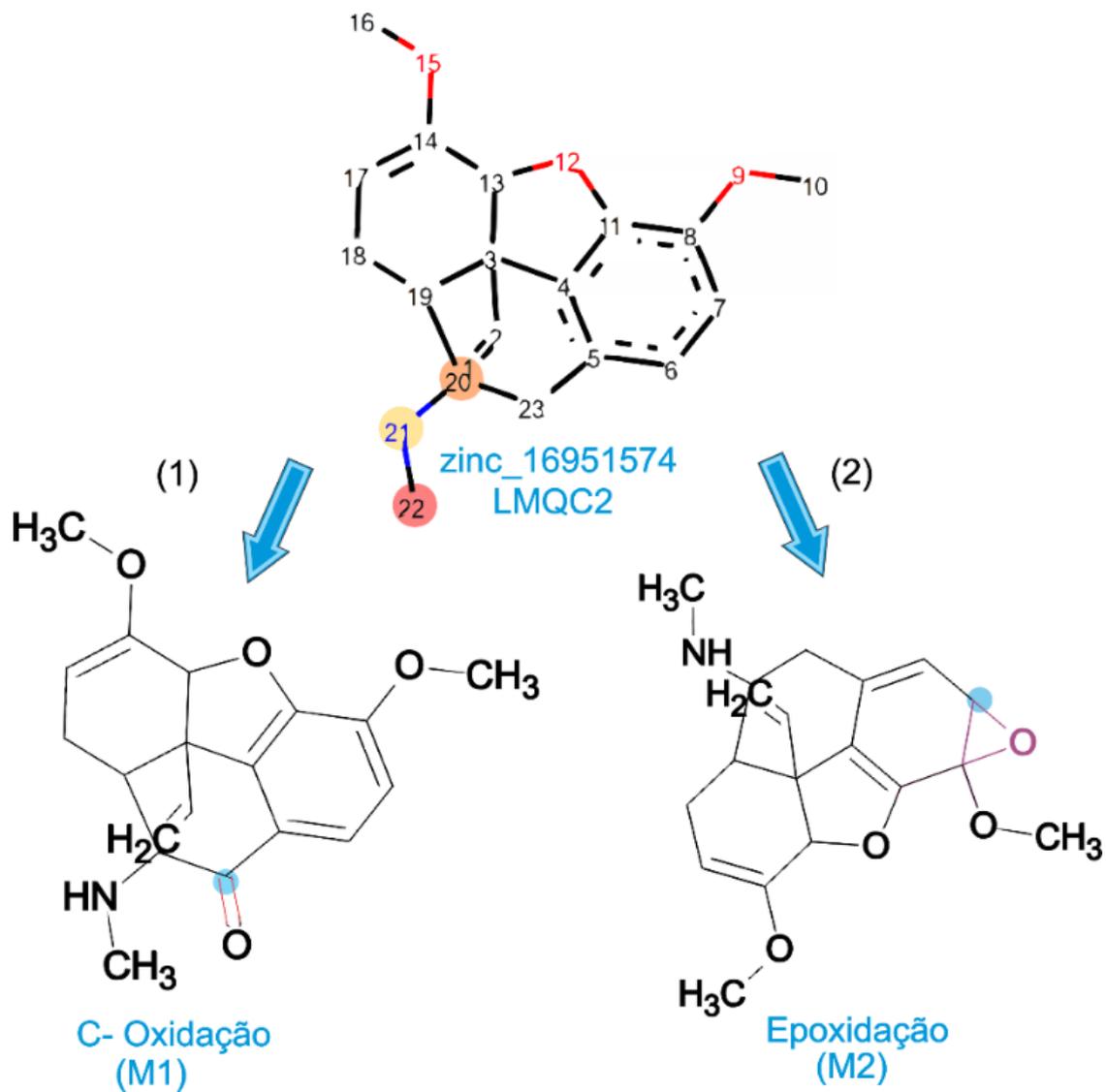
Utilizando a metodologia de ancoragem selecionada, identificamos um potencial modo de ligação para o composto capaz de interagir com o sítio enzima acetilcolinesterase como potencial ativo, similar à pose cristalográfica observada para a Galantamina (PDB ID 4EY6) em torno da hélice alfa localizada entre os resíduos de aminoácidos TRP-86A, GLU-202A e TYR-337A.

5.9.1 Predição do metabolismo utilizando o software metatox

De acordo com o servidor online Metatox os seguintes metabólitos da molécula de zinc_16951574 (LMQC2) e zinc_8342556 (LMQC5) poderiam sofrer metabolização, ver Figura 17 e Figura 18:

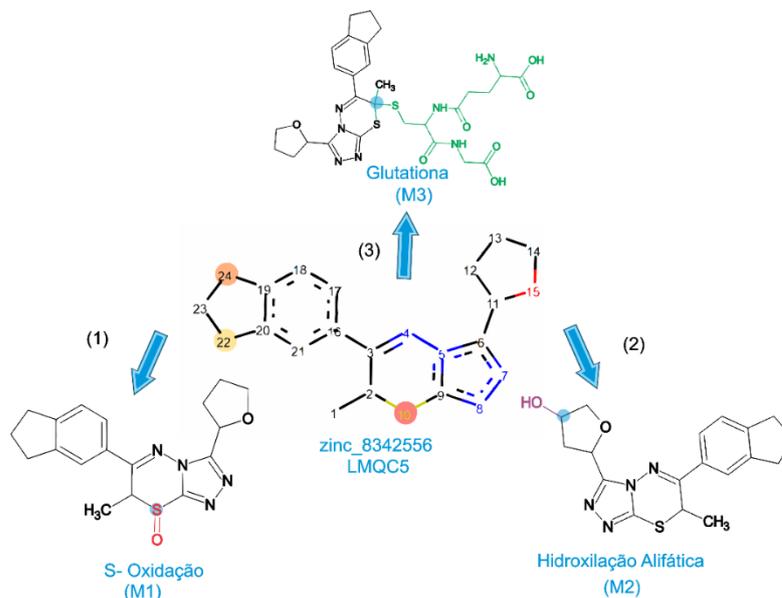
As predições para os compostos a zinc_16951574 (LMQC2) e zinc_8342556 (LMQC5) mostram que ocorrem as seguintes reações por metabolização: C-Oxidação, S-Oxidação, Hidroxilação Alifática, Epoxidação e Glutaciona, pela enzima CYP 450 de reações de Fase I e II (Figura 17 e Figura 18).

Figura 17- Predição no Metatox da zinc_16951574 (LMQC2) com os metabólitos e suas respectivas reações químicas.



Fonte: Autoria Própria

Figura 18- Predição no Metatox da zinc_8342556 (LMQC5) com os metabólitos e suas respectivas reações químicas.



Fonte: Autoria Própria

As reações catalisadas são geralmente divididas em dois grupos, chamados fase I e fase II (DE SOUZA; MATIAS PEREIRA; VIANA; FERREIRA *et al.*, 2019). Estas reações expõem ou introduzem um grupo funcional, por exemplo –OH ou –COOH, normalmente resulta em um pequeno aumento na hidrofiliicidade. As reações de biotransformação da Fase II incluem, por exemplo, conjugação com aminoácidos (como glicina) e glutaciona (TAXAK; BHARATAM, 2014), como pode se observar na Tabela 8 e Tabela 9:

Tabela 8- Metabólitos prováveis para o zinc_16951574 (LMQC2), reações químicas e valores da probabilidade de a reação acontecer e DL50

#	zinc_16951574 (LMQC2)		
	Tipo de Fase	Reação Química	Probabilidade (PR)
M1	Reação de Fase I	C- Oxidação	0.8283
M2	(Oxidação)	Epoxidação	0.9975

Fonte: Autoria Própria

De acordo com a Tabela 8, o possível metabólito M1 da molécula zinc_16951574 (LMQC2) é formado pela reação de Epoxidação, ao qual a epóxido hidrolase catalisa a trans adição de água que podem se formar durante a oxidação dependente do citocromo P450 de alcenos alifáticos (KIRCHMAIR 2015).

Este metabólito apresenta Arritmia e é carcinogênico na bexiga urinária em ratos e camundongos machos. Os alvos preditos para este metabólito pelo programa foram inibidores da acetilcolinesterase e da butilcolinesterase, sendo uma importante propriedade neste estudo. O M2 não apresentou efeito colateral, todavia apresentou-se carcinogênico no fígado em camundongos machos e no pulmão nas fêmeas(RAMCHANDANI, 2013).

Tabela 9- Metabólitos prováveis para o zinc_8342556 (LMQC5), reações químicas e valores da probabilidade de a reação acontecer

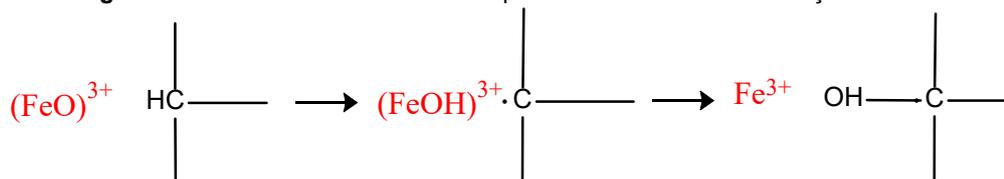
#	zinc_16951574 (LMQC2)		
	Tipo de Fase	Reação Química	Probabilidade (PR)
M1	Reação de Fase I	S- Oxidação	0.9975
M2	(Oxidação)	Hidroxilação Alifática	0.9965
M3	Reação de Biotransformação de Fase II	Glutaciona	0.9950

Fonte: Autoria Própria

De acordo com a Tabela 9, o metabólito M1 apresentou reação de S- Oxidação com a probabilidade de ocorrer de 0, 9885 e não apresentou efeito colateral.

O metabólito M2, ver Tabela 9, apresenta reação de hidroxilação alifática que envolve a inserção de oxigênio em uma ligação C – H, ver Figura 19. No caso de hidrocarbonetos simples, de cadeia linear, a hidroxilação alifática ocorre nos grupos metilo terminais e nos grupos metileno internos(KIRCHMAIR 2015). A oxidação de alguns alcenos alifáticos produzem metabolitos que são suficientemente reativos para se ligarem covalentemente à porção heme do citocromo P450(PARKINSON; OGILVIE, 2007). O metabólito M2 apresentou como efeito colateral a insuficiência cardíaca. Com uma probabilidade de ser carcinogênico no estômago em camundongos fêmeas e em ratos machos, e carcinogênico no sistema vascular em ratas fêmeas.

Figura 19- As enzimas P450 catalisam preferencialmente a hidroxilação



Fonte: Adaptado Parkinson e Ogilvie (2007)

Para a predição do metabólito M3, conforme Tabela 9, que é uma reação de Fase II, formado pela reação de conjugação de xenobióticos com o tripeptídeo glutathione, que é composto por glicina, cisteína e ácido glutâmico(KIRCHMAIR 2015). A Conjugação de xenobióticos com glutathione é fundamentalmente diferente de sua conjugação com outros aminoácidos e dipeptídeos(SIES, 1988), o metabólito M28 não apresentou nenhum efeito colateral, mas é carcinogênico nos rins em camundongos machos e na pele em ratos machos.

5.9.2 ADME/Tox

A predição de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/Tox) para os metabólitos formados dos compostos zinc_16951574 (LMQC2) e zinc_8342556 (LMQC5) é mostrado conforme obtidas do servidor PreADMET.

A absorção intestinal humana (HIA) e penetrabilidade celular in vitro usando modelo de células Caco₂ foram utilizados para descreverem a absorção intestinal de fármacos. Todos os metabólitos dos compostos zinc_16951574 (LMQC2) e zinc_8342556 (LMQC5) apresentaram como sendo bem absorvidos (IAH≥70%), ver Tabela 10.

Os resultados de PCaco-2 mostraram valor médio de 22.9435 nm/s, e de acordo com os valores podem ser classificados como permeabilidade média (valor entre 4 e 70 nm/s). O MDCK pode ser usado como uma ferramenta para a triagem rápida de permeabilidade. Quanto a depuração renal, os compostos zinc_16951574 (LMQC2) e zinc_8342556 (LMQC5) e todos os metabólitos apresentaram media permeabilidade (>4-70nn/sec).Os compostos mostraram valores negativos da Ppele, isto é, não serão administrados por via transdérmica. Mas podem ser considerados com ação tópica, por exemplo, repelentes (Tabela 10).

Tabela 10- Propriedades de absorção dos metabólitos dos compostos mais promissores

ABSORÇÃO E EXCREÇÃO					
COMPOSTO	Metabólito	HIA (%)	PCaco-2 (nm/sec)	Ppele (cm/h)	PMDCK (nm/sec)
zinc_16951574 (LMQC2)	M1	95.758170	51.9435	-3.92615	283.166
	M2	95.874961	53.1166	-4.44136	57.8788
zinc_8342556 (LMQC5)	M1	99.307339	20.3666	-4.1935	80.2919
	M2	97.599836	23.6799	-4.41052	84.5731
	M3	95.758170	22.9435	-4.31616	84.0711

Fonte: Autoria Própria

Com relação às propriedades de distribuição utilizou-se os parâmetros: ligação à proteínas plasmáticas (PPB (%), coeficiente de partição cérebro/sangue BBB e (C.brain/C.blood). Neste estudo, os valores calculados de PPB variaram de 29.66% e 96.36%, onde os metabólitos dos compostos estudados mostraram fracamente ligados com as proteínas plasmáticas com valor menor que 90%, com exceção dos metabólitos M1 e M3 do composto zinc_8342556 (LMQC5) que apresentaram fortemente ligados à proteínas plasmáticas (PPB >90%).

A penetração da barreira hematoencefálica é um fator crítico no campo farmacêutico, e compostos inativos no SNC (Sistema nervoso central) não devem atravessar, a fim de evitar efeitos colaterais (AJAY; BEMIS; MURCKO, 2000). Dos compostos investigados para este parâmetro, todos os compostos apresentaram valor de C_{Brain}/C_{blood} menor que 1, caracterizando efeitos inativos no SNC.

Tabela 11- Distribuição das propriedades de PPB e de penetração da barreira Hematoencefálica para os metabólitos dos compostos mais promissores

Distribuição			
COMPOSTO	Metabólito	PPB (%)	BBB C_{Brain}/C_{Blood}
zinc_16951574 (LMQC2)	M1	44.430986	0.663151
	M2	29.666364	0.476563
zinc_8342556 (LMQC5)	M1	96.361373	0.96609
	M2	89.331353	0.246839
	M3	90.730886	0.233788

Fonte: Autoria Própria

Os resultados referentes as previsões das propriedades toxicológicas (mutagenicidade e carcinogenicidade) dos metabólitos dos compostos zinc_16951574 (LMQC2) e zinc_8342556 (LMQC5), estão descritos na Tabela 12. As previsões de mutagenicidade, foram avaliadas utilizando-se o teste de Ames, enquanto que na carcinogenicidade utilizou-se ratos e camundongos como modelo animal.

O ensaio de carcinogenicidade visa identificar o potencial cancerígeno em animais e avaliar o risco em seres humanos, e, a predição no rato nos metabólitos dos compostos LMQC2 e LMQC5 apresentaram evidência de atividade carcinogênica. Nos Camundongos, apenas o M1 e M2 do composto LMQC2 obteve previsão positiva, isto é, não há evidência de atividade carcinogênica.

Tabela 12- Propriedades toxicológicas, cancerígenas e de Mutagenicidade para os metabólitos dos compostos mais promissores

COMPOSTO	METABÓLITOS	Carcinogenicidade		Teste de Ames
		Rato	Camundongo	Mutagenicidade
zinc_16951574 (LMQC2)	M1	Negativo	Positivo	Mutagênico
	M2	Negativo	Positivo	Mutagênico
zinc_8342556 (LMQC5)	M1	Negativo	Negativo	Mutagênico
	M2	Negativo	Negativo	Mutagênico
	M3	Negativo	Negativo	Mutagênico

Fonte: Autoria Própria

Os outros metabólitos dos compostos LMQC5 apresentaram uma previsão negativa, o que pode caracterizar atividade carcinogênica. Ao analisar a mutagenicidade, todos os metabólitos dos compostos LMQC2 e LMQC5 mostraram previsões mutagênicas, ver Tabela 12.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos por meio da modelagem computacional constituem etapas importantes do ponto de vista tecnológico (IVANOV; LAGUNIN; POROIKOV, 2016), pois compreende o conjunto de conhecimentos necessários para a formação de novos medicamentos, visto que esta fase de produção resulta em uma série de testes de eficácia, toxicidade, testes farmacológicos, dentre outros.

A HCA foi adequado para a validação de modelo farmacofórico, visto que é possível visualizar a disposição das moléculas em relação às suas semelhanças estruturais e, assim, realizar suposições de como podem agir contra a doença. Além disso, a síntese destas substâncias e de derivados planejados, permite que se estabeleça o farmacóforo e que se module o perfil biológico, representando uma excelente oportunidade para a atuação de químicos orgânicos sintéticos e medicinais na sintomatologia de diversas doenças, inclusive da doença de Alzheimer.

Os compostos LMQC2 e LMQC5 apresentaram um perfil potencial, sugerindo seletividade e propriedades inibitórias satisfatória para a *hAChE*, fornecendo vias para enriquecer a presente base de dados entre um conjunto de compostos estruturalmente relacionados por meio de triagem virtual baseado em farmacóforo, seguido de predições metabólicas no sítio citocromo P450 e sendo menos tóxicos com melhor absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), acarretando assim um início de uma nova etapa para a Química Medicinal Computacional.

O presente trabalho utilizou metodologias para predizer uma etapa importante nas interações das estruturas com resíduos de aminoácidos no sítio ativo de ligação da *hAChE*, visto que os aminoácidos são muito versáteis (SANTOS *et al.*, 2015), atuando como neurotransmissores, como por exemplo, no Sistema Nervoso Central, ao qual estimula um neurotransmissor excitatórios e/ ou inibitórios. Os compostos selecionadas necessitam serem testadas *in vitro* ou *in vivo*, afim de confirmar a atividade inibitória para a *hAChE*, bem como as predições *in silico*.



7 REFERÊNCIA

ACD, L. **ChemsketchFeware**, Toronto, 2010.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KETTLE, C.; MORTON, D. W. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 106, p. 553-565, 2018.

AJAY, G.; BEMIS, W.; MURCKO, M. Designing Libraries with CNS Activity. **Journal of medicinal chemistry**, p. 4942-51, 2000. ISSN 10.1021/jm990017w.

ALZHEIMER, A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. **Neurol Central**, v. 25, p. 1134., 1906.

ANDRADE, P. Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi*. 2012. 53f. Tese (Doutorado. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, Universidade de São Paulo, 2014.

ANITHA, K. et al. Molecular docking study on dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Int. J. Res. Dev. Pharmacy Life Sci.** , p. 602-610, 2013.

ATANASOVA, M. Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Bioorganic& Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 5382–5389, 2015.

BIOVITA FOUNDATION. **Discovery Studio – Accelrys. Versão 4.0. San Diego**, 2012.

BIRCK, M. G.; CAMPOS, L. J.; MELO, E. B. Computacional study of 1h-imidazol-2-yl-pyrimidine-4, 6-diamines for identification of potential parent compounds of new antimalarial agents. **Química Nova**, v. v. 39, n. n. 5 , p. p. 567-574, 2016.

CARVALHO, A. S.; SILVA, L. B.; SANTOS, K. L. B. A QUÍMICA DOS FÁRMACOS: UMA ABORDAGEM NO ENSINO E APRENDIZADO DE FUNÇÕES ORGÂNICAS. **58 CBQ**, 2018. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2018/trabalhos/6/index.html>>. Acesso em: 08 jul. 2019.

CARVALHO, I. E. A.. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quím. Nova**, São Paulo, v. v. 26, n. n. 3, p. p. 428-438 , Maio 2003.

COLLEGE, N. W.; BETTY, Z. Multimedia Neuroscience ducation Project. **Synaptic Transmission: A Four Step Process**, 1998.

COSTA, J. S. et al. Virtual Screening and Statistical Analysis in the Design of New Caffeine Analogues Molecules with Potent, 2018.

- CUNHA, E. L., SANTOS, C. F., BRAGA, F. S., Costa, J. S., SILVA, R. C., FAVACHO, H. A., ... & SANTOS, C. B. Computational investigation of antifungal compounds using molecular modeling and prediction of ADME/Tox properties. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**, 12(10), 2015, 3682-3691.
- DIAS, K. S. T. Aplicações Recentes da Abordagem de Fármacos Multialvo para o Tratamento da Doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, 2015.
- DMITRIEV, A. V. Pure Appl. **Chem., in press.**, 2017. ISSN DOI 10.1515/pac-2016-1205.
- FERREIRA, M. M. C. Quimiometria – conceitos, métodos e aplicações. **Unicamp**, Campinas, p. 493 , 2015.
- FORSTL, H.; KRUZ, A. Clinical features of Alzheimer's disease. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, p. 249, 288, 1999.
- FOSTER, J. R.; ROBERTS, R. In Carcinogenesis; Comprehensive Toxicology. **Elsevier Limited.: Kidlington, United Kingdom**, v. 14, n. 2, p. 1-10, 2010.
- GIACOBINI, E. Pharmacotherapeutic Approach to the Treatment of Alzheimer Disease, 1999. ISSN 10.1007/978-88-470-2149-5_11.
- GOEL, R. et al. PASS-Assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. **Med Chem Res**, p. Med Chem Res, 2011.
- GOMBAR, V. K. et al. In Computational Toxicology Risk Assessment for Pharmaceutical and Environmental Chemicals. **Wiley Series on Technologies for the Pharmaceutical Industry; John Wiley and Sons: Hoboken**, 2007.
- HANSEN, R. A. Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, and Rivastigmine for the Treatment of Alzheimer's disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Interventions in Aging**, v. 3, p. 211, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Síntese de Indicadores Sociais Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira**. IBGE. Rio de Janeiro. 2018.
- IUPAC Online Version, Terms Starting. **IUPAC Glossary of Terms Used in Toxicology**. Disponível em: <with C. <http://sis.nlm.nih.gov/enviro/iupacglossary/glossaryc.html> >. Acesso em: Dezembro 2018.
- IVANOV, S. M.; LAGUNIN, A. A.; POROIKOV, V. V. In silico assessment of adverse drug reactions and associated mechanisms. **Drug Discov**, n. 21, p. 58–71, 2016.
- KIRCHMAIR, E. A. Predicting drug metabolism: experiment and/or computation? **Nat. Rev. Drug Discov.**, p. 14: 387, 2015.
- KOES, D. R.; CAMACHO, C. J. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database.. **Nucleic Acids Res**, 2012.

LANCTOT, K. L. . R. R. D.; HERRMANN, N. Therapy for Alzheimer's disease: How Effective Are Current Treatments?. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 2, p. 163, 2009.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. *Química Nova*, v. v. 30, n. n. 6, p. p. 1456–1468, 2007.

MASSOVA, I. **Applications of molecular modeling to drug design**. Wayne State University, 1997. 0591665174.

MÖLLER, H. J.; GRAEBER, M. B. The case described by Alois Alzheimer 1911. **Eur. Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 111, p. 248, 1998.

MONTANARI, C. A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.

MUCKE, L. Neuroscience: Alzheimer's disease. **Nature**, v. 7, p. 461. 895, 2009. ISSN 10.1038/461895a.

MUSTER, W. Computational toxicology in drug development. **Drug Discov**, 2015.

PALOP, J. J.; MUCKE, L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, 17, n. 12, p. 777-792, 2016.

PARKINSON, A.; OGILVIE, B. **Biotransformation of Xenobiotics**. [S.l.]: [s.n.], 2007.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. **Oxford University Press**, 2001.

POROIKOV, V. V. et al. PASS Biological Activity Spectrum Predictions in the Enhanced Open NCI Database Browser.. **J. Chem. Inform. Comput. Sci.**, 2003.

SADYM, A.; LAGUNIN, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. Prediction of biological activity spectra via the Internet. **SAR and QSAR in Environmental Research**, 14, n. 5-6, p. 339-347, 2003.

QIKPROP. **Schrödinger, LLC, version 3.4, Schrödinger**: New York, NY, 2011.

RAMCHANDANI, V. A. Genetics of alcohol metabolism. In: Alcohol, nutrition, and health consequences. **Humana Press**, Totowa, p. p. 15-25, 2013.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, D. J. Glutamate Receptor Function in Learning and Memory. **Behavioral Brain Research**, v. 1, p. 140, 2003.

RODRIGUES, R. P. et al. Using Free Computational Resources To Illustrate the Drug Design Process in an Undergraduate Medicinal Chemistry Course. **J. Chem. Educ.**, v. 92, n. 5, p. 827-835, 2015. ISSN <https://doi.org/10.1021/ed500195d>.

RUDI, A. Prediction of metabolites of epoxidation reaction in MetaTox. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, p. 57: 638, 2017.

SANTOS, C. B. R. et al. Rational Desing of antimalarial drugs using molecular modeling and statistical analysis, v. 21, n. n. 28, 2015. p. 4112-4127.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucl. Acids. Res**, v. 36, p. p. W223-W228, 2008.

SCHRÖDINGER. **QikProp**: Rapid ADME predictions of drug candidates. Versão 3.4. New York, 2011.

SEIDL, C. Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase. **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2010.

SIES, H. Glutathione conjugation. **Academic Press**, London, 1988.

SMITH, D. A.; WATERBEEMD, H. V. D.; WALKER, D. K. Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design. **Wiley-VCH**, Berlim, p. pp. 75-97, 2001.

STATISTICA. (**Data Analysis Software System**); **Version 6.1**, StatSoft, Inc., 2004.

TAXAK, N.; BHARATAM, P. V. Drug metabolism. **Resonance**, v. v. 19, n. n. 3, p. p. 259-282, 2014.

VIEGAS JÚNIOR, C. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química nova**, 2004.

WANG, B. E. A. New insights into the structural characteristics and functional relevance of the human cytochrome P450 2D6 enzyme. **Drug Metab**, v. Rev. 41, p. 573-643, 2009.

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

YANG, Z.; ZHANG, Y.; YANG, Y.; SUN, L. et al. Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 6, n. 3, p. 427-441, 2010/06/01/ 2010.