



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**FRANCIANE NUNES DE SOUZA**

---

---

**PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS MULTIALVO PARA TRATAMENTO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER: INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE E  
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE**

---

---

**Macapá**  
**2021**

**FRANCIANE NUNES DE SOUZA**

---

---

**PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS MULTIALVO PARA TRATAMENTO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER: INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE E  
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE**

---

---

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lorane Izabel da Silva Hage Melim

**Macapá**  
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá  
Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

Souza, Franciane Nunes de.

Planejamento de fármacos multialvo para tratamento da doença de Alzheimer: inibidores de acetilcolinesterase e óxido nítrico sintase. / Franciane Nunes de Souza; orientadora, Lorane Izabel da Silva Hage-Melim. – Macapá, 2021.  
107 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Doença de Alzheimer. 2. Medicina popular. 3. Plantas medicinais. 3. Acetilcolinesterase. 4. Óxido nítrico. I. Hage-Melim, Lorane Izabel da Silva, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

615.321 S729p  
CDD. 22 ed.

---

**FRANCIANE NUNES DE SOUZA**

**PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS MULTIALVO INIBIDORES DE  
ACETILCOLINESTERASE E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE PARA TRATAMENTO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data de Aprovação: 27/08/2021

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lorane Izabel da Silva Hage Melim**

---

**Prof. Dr. Gabriel Araujo da Silva**

---

**Prof. Dr. Josivan da Silva Costa**

---

**À minha família que é minha base e minha fortaleza, em especial à minha mãe,  
que sempre foi a minha maior incentivadora**

---

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente a Deus por guiar meus passos e me permitir alcançar mais essa grande conquista.

À minha família, que sempre estiveram ao meu lado dando apoio e ajudando a superar as dificuldades da vida.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lorane Izabel da Silva Hage Melim, pela disponibilidade, ensinamentos e paciência, tudo isso foi fundamental para realizar e prosseguir este estudo.

Aos meus amigos do Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (PharMedChem), que fizeram parte dessa jornada, obrigada pela troca de experiências.

À todos os colegas da turma de mestrado 2019, colaboradores e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos e apoio.

---

**Introdução:** A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa, sendo o tipo de demência mais comum entre pessoas idosas. Neste estudo, as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e óxido nítrico sintase (NO) foram selecionadas por serem alvos significativos para drogas terapêuticas. A AChE constitui importante alvo farmacológico em decorrência de seu papel na fisiopatologia da doença de Alzheimer; assim como, a enzima NOS que colabora para o desenvolvimento e progressão da doença. **Objetivo:** Assim, o objetivo deste estudo foi planejar moléculas de produtos naturais isoladas de plantas medicinais capazes de inibir a atividade enzimática da AChE e NOS para o desenvolvimento de fármacos voltados para o tratamento da doença de Alzheimer. **Material e Métodos:** Inicialmente, foram selecionadas 24 moléculas de produtos naturais da literatura, realizaram-se métodos de modelagem como: estudos de orbitais de fronteira (HOMO e LUMO), mapas de potencial eletrostático, estudo de *docking* molecular, identificação do padrão farmacofórico, avaliação de propriedades farmacocinéticas (ADME) e Toxicológicas (TOX). **Resultados e discussão:** Na análise estatística dos descritores o valor mais relevante segundo a correlação de Pearson foi entre HOMO e GAP, apresentando valor igual a 1. Os valores máximo positivo e negativo de MEPs variaram de 0,0871 a -0,11 para a luteolina. Na derivação do grupo farmacofórico, foram alinhadas 9 moléculas, contendo três grupos farmacofóricos: dois aceitadores de ligação de hidrogênio e um anel aromático. No estudo de *docking*, as moléculas estudadas interagiram com o sítio ativo da AChE por meio ligações hidrofóbicas e de hidrogênio, e com a NOS por meio de interações de hidrogênio. Na predição farmacocinética e toxicológica, a molécula calebina-A se destacou apresentando o melhor resultado. Dentre todas as moléculas, as que foram mais bem avaliadas em todas as predições, foram: calebina-A, luteolina e quercetina. Com o objetivo de melhorar alguns padrões das estruturas moleculares que obtiveram resultados satisfatórios entre os produtos naturais avaliados, foram feitas 30 modificações planejadas para a estrutura de luteolina, quercetina e calebina-A, sendo 10 análogos para cada uma dessas. **Conclusões:** O planejamento de análogos destas moléculas apresentou resultados satisfatórios no *docking* molecular, farmacocinética e toxicidade. Portanto, demonstraram serem análogos potenciais para futuros estudos *in vivo* e *in vitro* para o planejamento de moléculas com ação anti-Alzheimer.

**Palavras-Chave:** Doença de Alzheimer; Acetilcolinesterase; Óxido Nítrico Sintase; Produtos Naturais.

**Agradecimentos:** CNPq e INCT-INOVAR.

---

## ABSTRACT

---

**Introduction:** Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease, being the most common type of dementia among elderly people. In this study, the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and nitric oxide synthase (NOS) were selected as they are significant targets for therapeutic drugs. AChE is an important pharmacological target due to its role in the pathophysiology of Alzheimer's disease; as well as the NOS enzyme that contributes to the development and progression of the disease. **Objective:** Thus, the aim of this study was to plan natural product molecules isolated from medicinal plants capable of inhibiting the enzymatic activity of AChE and NOS for the development of drugs aimed at the treatment of Alzheimer's disease. **Material and Methods:** Initially, 24 molecules of natural products from the literature were selected, molecular modeling methods were carried out, such as: border orbital studies (HOMO and LUMO), electrostatic potential maps, molecular docking study, identification of the pharmacophoric pattern, evaluation of pharmacokinetics (ADME) and toxicological (TOX) properties. **Results and discussion:** In the statistical analysis of the descriptors, the most relevant value according to Pearson's correlation was between HOMO and GAP, with a value equal to 1. The maximum positive and negative values of MEPs ranged from 0.0871 to -0.11 for the luteolin. In the derivation of the pharmacophoric group, 9 molecules were aligned, containing three pharmacophoric groups: two hydrogen bond acceptors and an aromatic ring. In the docking study, the molecules studied interacted with the active site of AChE through hydrophobic and hydrogen bonds, and with NOS through hydrogen interactions. In the pharmacokinetic and toxicological prediction, the calebin-A molecule stood out with the best result. Among all the molecules, the ones that were best evaluated in all predictions were: calebin-A, luteolin and quercetin. In order to improve some patterns of molecular structures that obtained satisfactory results among the natural products evaluated, 30 planned modifications were made to the structure of Luteolin, Quercetin and Calebin-A, 10 being analogous for each of these. **Conclusions:** The design of analogues of these molecules showed satisfactory results in molecular docking, pharmacokinetics and toxicity. Therefore, they proved to be potential analogues for future in vivo and in vitro studies for the design of molecules with anti-Alzheimer action.

**Keywords:** Alzheimer's Disease; Acetylcholinesterase; Nitric Oxide Synthase; Natural products.

**Acknowledgments:** CNPq and INCT-INOVAR.

---

## LISTA DE FIGURAS

---

|                    |                                                                                  |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1 -</b>  | Processo de agregação do peptídeo $\beta$ A.....                                 | 18 |
| <b>Figura 2 -</b>  | Fármacos aprovados pela FDA para tratamento da Doença de Alzheimer.....          | 20 |
| <b>Figura 3-</b>   | Fluxograma com as etapas da pesquisa.....                                        | 28 |
| <b>Figura 4-</b>   | Estruturas químicas dos produtos naturais.....                                   | 29 |
| <b>Figura 5 -</b>  | Apresentação dos orbitais HOMO para as moléculas de produtos naturais.....       | 37 |
| <b>Figura 6 -</b>  | Apresentação dos orbitais LUMO para as moléculas de produtos naturais.....       | 38 |
| <b>Figura 7 -</b>  | Apresentação visual dos MEP'S.....                                               | 42 |
| <b>Figura 8 -</b>  | Modelo farmacofórico construído com auxílio do Webservidor Pharmagist.....       | 45 |
| <b>Figura 9 -</b>  | Estrutura de análogos de Luteolina.....                                          | 80 |
| <b>Figura 10 -</b> | Estrutura de análogos de Quercetina.....                                         | 80 |
| <b>Figura 11 -</b> | Estrutura de análogos de Calebina-A.....                                         | 80 |
| <b>Figura 12 -</b> | Interações entre AChE e os análogos.....                                         | 87 |
| <b>Figura 13-</b>  | Interações entre NOS e os análogos.....                                          | 87 |
| <b>Figura 14-</b>  | Principais estruturas responsáveis por alerta plausível em hepatotoxicidade..... | 90 |

---

## LISTA DE TABELAS

---

|                    |                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1 -</b>  | Moléculas de produtos naturais isoladas de plantas medicinais com mecanismo de ação anti-Alzheimer.....                                                                                                                    | 23 |
| <b>Tabela 2 -</b>  | Descritores moleculares e correlação de Pearson.....                                                                                                                                                                       | 36 |
| <b>Tabela 3 -</b>  | Análise das interações intermoleculares entre a enzima NOS e o ligante cristalográfico e dos resultados de <i>Docking</i> Molecular entre a enzima NOS e as 24 moléculas de produtos naturais o ligante do complexo.....   | 48 |
| <b>Tabela 4 -</b>  | Apresentação das moléculas selecionadas para o estudo de <i>docking</i> molecular entre AChE e as moléculas de produtos naturais..                                                                                         | 49 |
| <b>Tabela 5 -</b>  | Análise das interações intermoleculares entre a enzima AChE e o ligante cristalográfico e dos resultados de <i>Docking</i> Molecular entre a enzima AChE e as 24 moléculas de produtos naturais o ligante do complexo..... | 58 |
| <b>Tabela 6 -</b>  | Apresentação das moléculas selecionadas para o estudo de <i>docking</i> molecular entre NOS e as moléculas de produtos naturais..                                                                                          | 59 |
| <b>Tabela 7 -</b>  | Predição de propriedades farmacocinéticas dos produtos naturais estudados calculadas usando o software QikProp.....                                                                                                        | 71 |
| <b>Tabela 8 -</b>  | Predição de propriedades toxicológicas dos produtos naturais estudados calculadas usando o software DEREK.....                                                                                                             | 76 |
| <b>Tabela 9 -</b>  | Predição de propriedades farmacocinéticas das modificações da Luteolina, Quercetina e Calebina-A.....                                                                                                                      | 88 |
| <b>Tabela 10 -</b> | Predição de propriedades toxicológicas das modificações da Luteolina, Quercetina e Calebina-A.....                                                                                                                         | 92 |

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

|           |                                                                                                                          |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2D        | Bidimensional                                                                                                            |
| 3D        | Tridimensional                                                                                                           |
| ACh       | Acetilcolina                                                                                                             |
| AChE      | Acetilcolinesterase                                                                                                      |
| ADME      | Absorção, distribuição, metabolismo e excreção                                                                           |
| APP       | Proteína precursora de $\beta$ -amilóide                                                                                 |
| DA        | Doença de Alzheimer                                                                                                      |
| DEREK     | Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge                                                                     |
| ET        | Energia total                                                                                                            |
| FAD       | Familial Alzheimer's Disease                                                                                             |
| FDA       | Food and Drug Administration                                                                                             |
| GOLD      | Genetic Optimization for ligand <i>Docking</i>                                                                           |
| MEP       | Mapas de potencial eletrostático molecular                                                                               |
| HOMO      | Orbital molecular ocupado de maior energia (High – throughput screening)                                                 |
| IACHes    | Inibidores de acetilcolinesterase                                                                                        |
| NOS       | Óxido Nítrico Sintase                                                                                                    |
| LOAD      | Late Onset Alzheimer's Disease                                                                                           |
| LUMO      | Orbital molecular desocupado de menor energia (Lowest unoccupied molecular orbital)                                      |
| NFT       | Novelos neurofibrilares                                                                                                  |
| QSAR      | Relação quantitativa entre a estrutura química e a atividade biológica (Quantitative structure – activity relationships) |
| SNC       | Sistema Nervoso Central                                                                                                  |
| $\beta$ A | Beta-amiloide                                                                                                            |
| TOX       | Toxicidade                                                                                                               |

---

---

|              |                                                                                                                                    |           |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                             | <b>14</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                              | <b>16</b> |
| 2.1          | OBJETIVOS GERAIS.....                                                                                                              | 16        |
| 2.1          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                         | 16        |
| <b>3</b>     | <b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>                                                                                                    | <b>17</b> |
| 3.1          | DOENÇA ALZHEIMER.....                                                                                                              | 17        |
| 3.2          | TRATAMENTOS DISPONÍVEIS.....                                                                                                       | 19        |
| 3.3          | ALVOS TERAPÊUTICOS.....                                                                                                            | 21        |
| 3.4          | PRODUTOS NATURAIS.....                                                                                                             | 22        |
| 3.5          | PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS.....                                                                                                      | 25        |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                                                    | <b>27</b> |
| 4.1          | MODELAGEM MOLECULAR DOS PRODUTOS NATURAIS<br>SELECIONADOS UTILIZANDO MÉTODO COMPUTACIONAL<br>VALIDADO.....                         | 27        |
| 4.2          | DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES MOLECULARES DOS<br>PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS UTILIZANDO O<br>MÉTODO COMPUTACIONAL VALIDADO..... | 30        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Determinação das propriedades moleculares dos produtos<br/>naturais selecionados .....</b>                                      | <b>30</b> |
| 4.2.1.1      | Descritores químico-quânticos.....                                                                                                 | 30        |
| 4.2.1.2      | Descritores relacionados às propriedades quantitativas de<br>estrutura química e atividade biológica .....                         | 30        |
| 4.3          | SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS E CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DE<br>DADOS .....                                                                     | 31        |
| 4.4          | MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO MOLECULAR<br>(MEP).....                                                                           | 31        |
| 4.5          | ESTUDO DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR USANDO O PROGRAMA<br>GOLD.....                                                                  | 31        |
| 4.6          | PREDIÇÃO DO PADRÃO FARMACOFÓRICO.....                                                                                              | 32        |

---

|         |                                                                                                                 |     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.7     | PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS (ADME) E TOXICOLÓGICAS (TOX) DOS PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS..... | 32  |
| 4.8     | PLANEJAMENTO DE ANÁLOGOS DOS PRODUTOS NATURAIS.....                                                             | 33  |
| 5       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                              | 34  |
| 5.1     | MODELAGEM MOLECULAR E CÁLCULOS DE DESCRITORES.....                                                              | 34  |
| 5.1.1   | <b>Análise estatística dos descritores.....</b>                                                                 | 34  |
| 5.2     | MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO MOLECULAR (MEPs).....                                                          | 41  |
| 5.3     | DERIVAÇÃO DO FARMACÓFORO.....                                                                                   | 44  |
| 5.4     | <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....                                                                                   | 45  |
| 5.5     | PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS.....                                                  | 70  |
| 5.6     | PLANEJAMENTO DAS MODIFICAÇÕES.....                                                                              | 77  |
| 5.6.1   | <b><i>Docking</i> molecular de análogos (luteolina, quercetina e calebina-A).....</b>                           | 77  |
| 5.6.1.1 | <i>Docking</i> molecular entre a enzima AChE e as modificações.....                                             | 78  |
| 5.6.1.2 | <i>Docking</i> molecular entre a enzima NOS e as modificações.....                                              | 83  |
| 5.6.1.3 | Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) e toxicológicas (TOX) das modificações.....                   | 86  |
|         | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                         | 95  |
|         | <b>ANEXO 1 – Normas de publicação dos respectivos periódicos</b>                                                | 107 |

O aumento da expectativa de vida da população mundial, levou a um crescimento no número de casos de pessoas com demências, sendo a doença de Alzheimer a principal causa de demência entre pessoas idosas. A doença de Alzheimer é vista mundialmente como um problema de saúde pública, acarretando custos para os cofres públicos em todo o mundo.

A doença de Alzheimer é caracterizada por alterações neurodegenerativas que levam ao surgimento de vários sintomas clínicos característicos da doença, os principais são: perda de memória, dificuldades na fala e realização de tarefas do cotidiano, bem como, outros sintomas peculiares da doença. A fisiopatologia da doença de Alzheimer é complexa e não muito bem esclarecida, mas de modo geral, seu surgimento está relacionado com a formação de emaranhados neurofibrilares e placas senis na região cerebral, alguns estudos também relatam uma ligação entre o surgimento da doença com processos neuroinflamatórios e estresse oxidativo.

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é um importante alvo terapêutico, pois devido aos seus pressupostos colinérgicos possui a capacidade de amenizar os sintomas relacionados à doença de Alzheimer. Já a enzima óxido nítrico sintase (NOS), está envolvida em eventos que levam ao acúmulo de peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) no cérebro, ocasionando a morte celular, o que também a torna um alvo terapêutico atrativo para o tratamento da doença de Alzheimer.

Os tratamentos disponíveis para a doença de Alzheimer visam apenas retardar os sintomas, visto que, não existe cura, mas sim tratamento que tem como objetivo, amenizar os sintomas causados pela doença e proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes. Neste contexto, por conterem várias substâncias que agem sinergicamente contra alvos moleculares, os produtos naturais se mostram como boas alternativas para serem utilizados no planejamento de fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Com o desenvolvimento tecnológico, os estudos *in silico* têm se mostrado aliados quando se pensa em desvendar as propriedades das moléculas de interesse e suas possíveis interações com o alvo biológico desejado. Dessa forma, esta

pesquisa objetivou estudar, através de método computacional, moléculas de produtos naturais selecionadas da literatura, para o planejamento de fármacos multialvo inibidores de AChE e NOS para o tratamento da doença de Alzheimer. Espera-se que, os resultados alcançados através do planejamento e testes feitos a partir da interação entre esses inibidores e os alvos, possam servir futuramente de modelo para o melhoramento de possíveis candidatos a fármacos para a utilização na terapêutica da doença de Alzheimer.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Planejar moléculas de origem natural com ação inibitória dos alvos terapêuticos Acetilcolinesterase (AChE) e Óxido nítrico sintase (NOS) para tratamento da doença de Alzheimer.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar métodos de modelagem molecular aos produtos naturais e determinar suas propriedades moleculares;
- Identificar, através do estudo de *docking*, o modo de ligação dos ligantes no sítio de ligação do receptor;
- Identificar o padrão farmacofórico dos produtos naturais;
- Avaliar as propriedades farmacocinéticas (ADME) e toxicológicas (TOX) dos produtos naturais selecionados;
- Propor alterações nas estruturas dos produtos naturais para se obter substâncias com atividade multialvo.

### 3.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

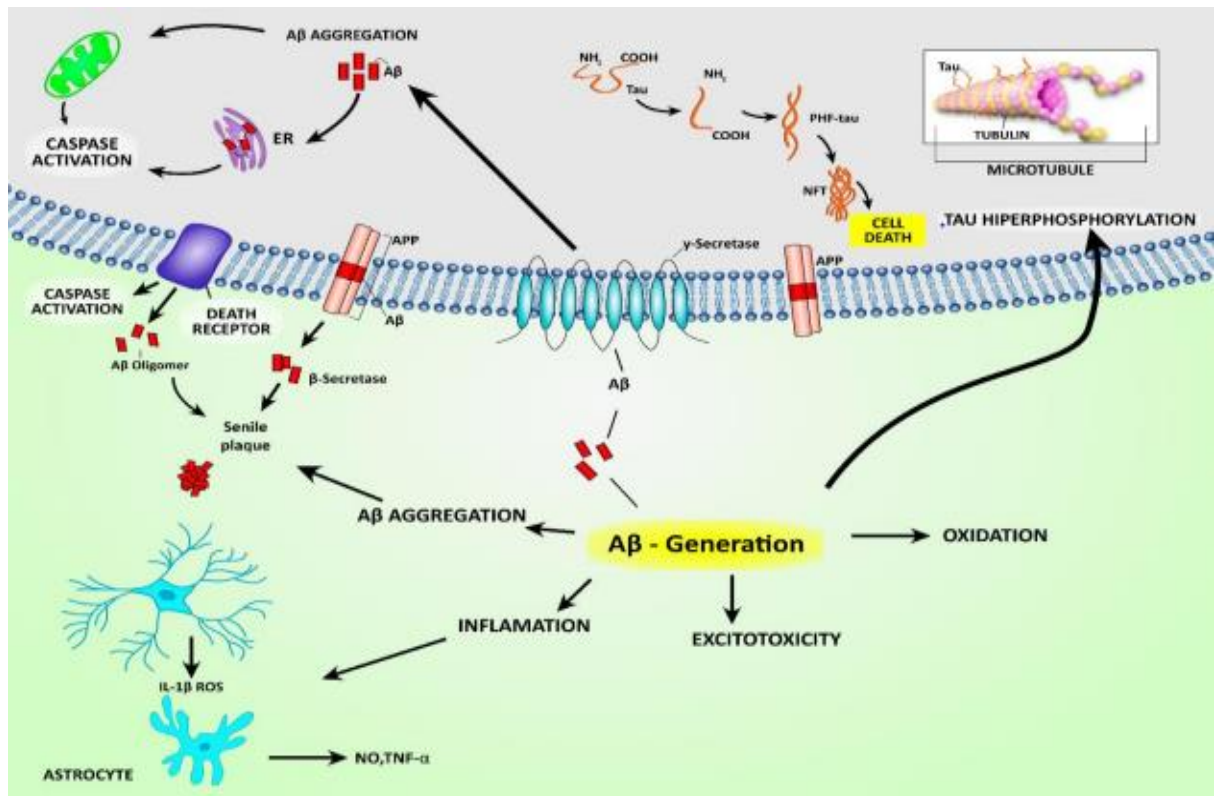
Ocorrem mais de 47 milhões de casos de demência por todo o mundo, e espera-se que esse número aumente para 131 milhões até 2050. (ROEHR et al., 2017). Esses casos de demência acometem cerca de 25% a 45% da população mundial com idade superior a 85 anos, na qual a doença de Alzheimer representa aproximadamente 50% dos casos (REZAZADEH et al., 2019).

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa e é a causa mais comum de demência, reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma prioridade de saúde pública global (RABBITO et al., 2020). É apresentada como uma doença relacionada à idade, e com prevalência e crescimento acelerado, em concomitância com o aumento da expectativa de vida proveniente do crescimento econômico (HABTEMARIAM, 2018).

Observa-se na doença de Alzheimer diversos sintomas como perda de memória, fala e raciocínio, bem como pela dificuldade de agir e realizar tarefas. Além disso, do mesmo modo estão presentes indícios neuropsiquiátricos e modificações no comportamento, particularmente depressão, ansiedade, agitação, apatia, alucinações, motricidade prejudicada, psicopatias, alterações do sono, mecanismos de fome e libido (BERNARDO, 2018). Sendo a doença de Alzheimer, uma patologia do sistema nervoso central (SNC), relatada pela primeira vez no estudo do psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1906, que descreveu manifestações clínicas que abrangiam lapsos de memória, delírios, dificuldades na fala, bem como cérebro atrofiado e com acumulações proteicas anormais, intituladas futuramente de placas senis e emaranhados neurofibrilares (FALCO et al., 2016).

Uma particularidade da doença de Alzheimer é a formação de placas senis na região cerebral, originadas pelo acúmulo da proteína A $\beta$  decorrente da fosforilação da proteína percussora amiloide (APP) (WANG M et al., 2017).

**Figura 1 – Processo de agregação do peptídeo  $\beta$ A**



Fonte: Picanço et al. (2017)

Outra característica da doença de Alzheimer, é a presença de emaranhados neurofibrilares (NFT), formados a partir da proteína Tau que passa por oligomerização e se transforma em filamentos helicoidais emparelhados. Pesquisas mostram que etapas pré-fibrilares de tau podem estar correlacionadas com sequelas neurotóxicas no cérebro (LUQUE et al., 2014).

Pesquisas mostram que causas vasculares, estresse oxidativo e um processo neuroinflamatório cerebral são preponderantes para o surgimento da doença de Alzheimer. Dentre os vários elementos preocupantes da doença de Alzheimer, os demais relevância são resposta imune e a inflamação (SOCHOCKA; ZWOLIŃSKA; LESZEK, 2017). Neuroinflamação é resultado de um mecanismo inflamatório no SNC, causada pela resistência a lesões e infecções, com uma grande concentração de células gliais. Em tal caso ocorre uma ativação das micróglia e astrócitos, ativadas por citocinas, quimiocinas, receptores de reconhecimento padrões e complemento (PRRs), fatores imunes celulares e moleculares, ocorre então, a produção de citocinas

pró-inflamatórias, particularmente IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , e formação adicional de A $\beta$  (SOCHOCKA; ZWOLIŃSKA; LESZEK, 2017).

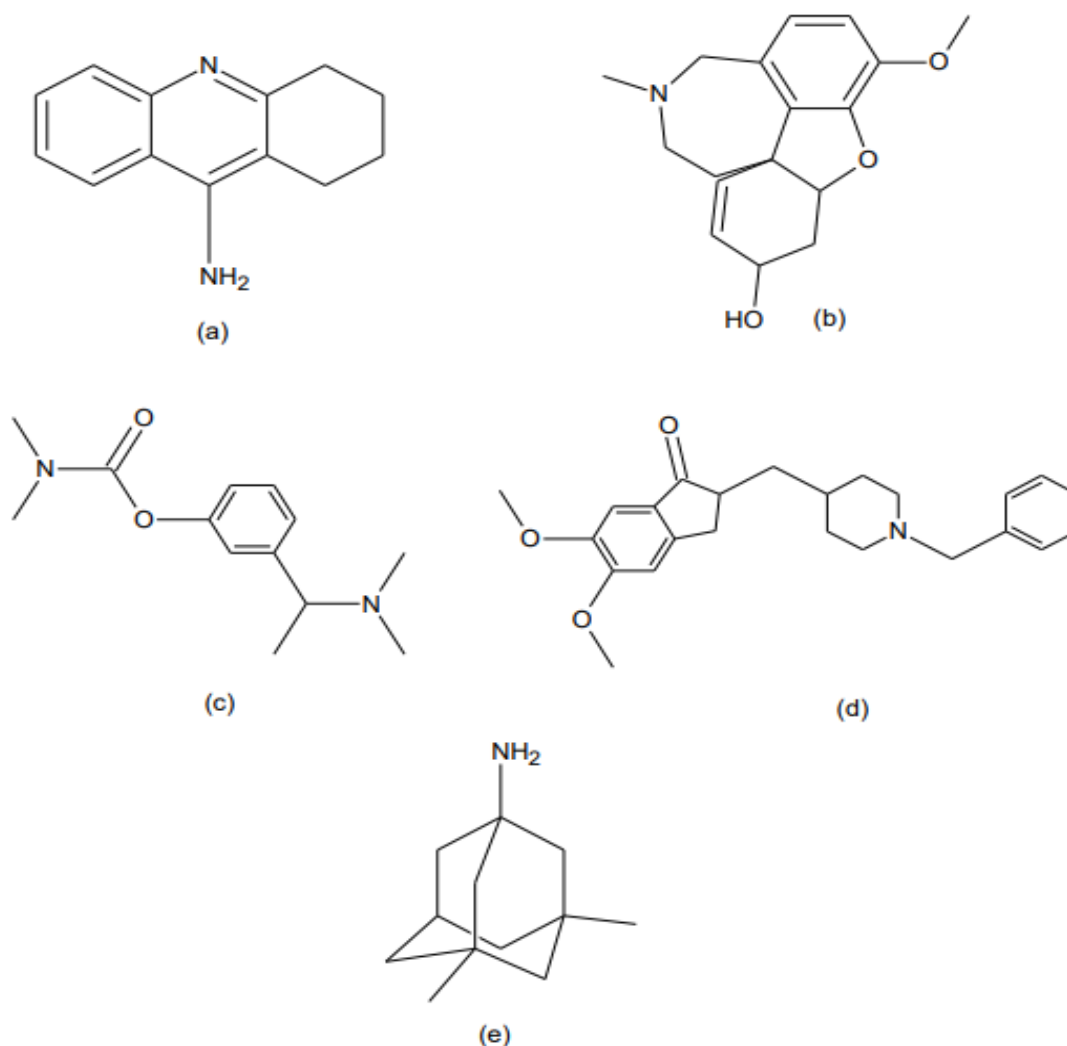
Mecanismos cerebrais inflamatórios intensos movidos por células gliais estimuladas induzem a restauração da região cerebral afetada, porém respostas inflamatórias persistentes acarretam um resultado autodestrutor do cérebro. Além do mais, uma inflamação persistente afeta a forma de limpeza de proteínas acumuladas anormalmente na região cerebral, que acarretam a formação de tau, aglomerado APP, produção de filamentos helicoidais e alteração sináptica (SOCHOCKA; ZWOLIŃSKA; LESZEK, 2017).

### 3.2 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

A atual abordagem de cuidados na doença de Alzheimer compreende a combinação de tratamento farmacológico e não farmacológico para atenuar a perda gradativa de capacidades cognitivas e funcionais. Não houve medicamento novo aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) após o ano de 2002, salvo a combinação de dois medicamentos já existentes. Entretanto, no decurso dos últimos 10 anos, múltiplos indícios de pesquisas emergiram para reforçar a efetividade da terapêutica da doença de Alzheimer (ATRI, 2019).

Pesquisas atuais voltadas para o tratamento da doença de Alzheimer com possíveis ações restaurativas são promissoras, porém precisam ser analisadas com cautela, já que a terapêutica medicamentosa para a doença de Alzheimer consiste em retardar o avanço de manifestações clínicas e debilidades, não havendo cura para a doença, embora exista um grande empenho, a descoberta da cura para a doença de Alzheimer não é realístico nos próximos anos (BRIGGS; KENNELLY; O'NEILL, 2016). Dessa forma, a terapêutica medicamentosa reconhecida pela FDA como donepezil, galantamina, rivastigmina e memantina, podem diminuir os sintomas, mas não impedem a progressão da doença (ATRI, 2019).

**Figura 2** – Fármacos aprovados pela FDA para tratamento da Doença de Alzheimer.



Em todo o mundo, um grande número de plantas tem sido utilizado para o tratamento de diversos tipos de demências, apresentando efeitos neuroprotetores, como exemplo: tem-se a família *Ginkgoaceae*, sendo utilizada em alguns transtornos cognitivos relacionados à idade, aliviando sintomas de demência. Assim sendo, esses compostos naturais se apresentam como importante alternativa para o tratamento da doença de Alzheimer (TEWARI et al., 2018).

Em relação aos gastos com saúde pública tratamentos que diminuem o contrapeso dos cuidadores e retardam a admissão dos pacientes em centros de saúde se mostram de grande valia quando se fala de economia nas contas públicas relacionadas à saúde (ATRI, 2019).

### 3.3 ALVOS TERAPÊUTICOS

Um grande número de plantas tem sido usado para o tratamento de demências em todo o mundo, pesquisas utilizando essas plantas para o tratamento de demências mostraram que são doenças complexas com múltiplos mecanismos moleculares envolvidos em seu surgimento. Com essa percepção, surgiu o novo paradigma para o tratamento dessas patologias: as terapias para as demências deveriam ter como alvo múltiplos alvos moleculares, em vez de se concentrar em um único. Assim, plantas e extratos de plantas são compostos de muitas substâncias que agem em vários alvos moleculares de forma aditiva ou mesmo sinérgica (TEWARI et al., 2018).

O reconhecimento da relevância de moléculas de ligação assim como compreender o funcionamento delas, permite antever resultados de características das drogas baseado em pesquisas quantitativas e ordenadas de medicamentos. Nesse sentido, vários questionamentos em farmacologia vêm sendo feitos como forma importante de reaproveitar fármacos e esclarecer o funcionamento de produtos naturais (WANG et al., 2017).

Descobrir proponentes a fármacos que exerçam efeitos de alta afinidade, que se agreguem a um único alvo em questão, tem demonstrado êxito em relação à terapêutica de patologias com surgimento e funcionamento definidos. Porém, quando comparados com estados patológicos complicados os medicamentos visando múltiplos alvos podem ser mais vantajosos do que medicamentos com um único alvo específico. Patologias complicadas não são causadas por falhas moleculares desacompanhadas, mas sim pelo arranjo de distúrbios moleculares. Neste caso, medicamentos multialvos seriam capazes de afetar a homeostase celular (WANG et al., 2017).

A doença de Alzheimer é marcada por variações cerebrais associadas a deteriorações no sistema colinérgico causando perda de memória. A hipótese colinérgica fundamenta que o aumento nos níveis cerebrais de ACh seja capaz de melhorar os processos envolvendo aprendizado e memória. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Nestas sinapses, a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro. Assim, quando inibida a AChE é impedida de hidrolisar a acetilcolina. Nesse sentido, a enzima AChE se apresenta como importante alvo

terapêutico para o tratamento da doença de Alzheimer pela sua ação desempenhada no SNC, devido aos seus pressupostos colinérgicos. Assim, possui a capacidade de amenizar os sintomas relacionados à doença de Alzheimer (XU et al., 2017).

Assim como a AChE, a enzima NOS também está envolvida em mecanismos de surgimento e agravamento da doença de Alzheimer, o estresse oxidativo causado pelo NO no cérebro foi proposto como um mecanismo patogênico, sendo sugerido que o NO desempenha um papel central na cascata de eventos que levam a acúmulo intracelular de A $\beta$  para aumentar a vulnerabilidade à apoptose e morte celular. NO desempenha certos papéis fisiológicos centrais. Portanto, projetar drogas que tenham como alvo uma isoenzima específica da NOS é de grande interesse para a busca por novas terapêuticas para a doença de Alzheimer (P FERNANDEZ, A et al., 2010).

### 3.4 PRODUTOS NATURAIS

A DA é considerada uma das doenças neurodegenerativas mais comuns, representando um dos principais focos da pesquisa neurocientífica para a compreensão das alterações celulares e da fisiopatologia e mecanismos envolvidos. Vários produtos naturais (NPs), incluindo flavonoides, são considerados capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e são conhecidos por sua atividade relacionada ao sistema nervoso central (SNC). Vários medicamentos ocidentais usados na perda de memória são derivados de plantas (HAGE-MELIM et al., 2019).

Os produtos naturais são uma fonte indispensável de fármacos e possuem uma melhor cobertura do espaço farmacológico do que os compostos sintéticos, devido à sua elevada diversidade estrutural (MOUMBOCK et al., 2019). Esses compostos possuem em sua composição várias substâncias que teoricamente agem em múltiplos alvos moleculares de uma forma sinérgica; havendo uma variedade de fitoterápicos sendo utilizados na terapia de doenças. Porém, ainda existe pouca informação em relação a interação dessas substâncias com drogas, e com elas mesmas. Neste contexto, estudos sobre essa temática são de grande relevância para propor novas formas de tratamento, com estruturas que interajam e aumentem a atividade uma das outras, e que não apresentem ações colaterais (TEWARI et al., 2018).

Logo abaixo, a Tabela 1 discorre sobre as moléculas de produtos naturais isoladas de plantas medicinais com mecanismos de ação anti-Alzheimer.

**Tabela 1** – Moléculas de produtos naturais isoladas de plantas medicinais com mecanismo de ação anti-Alzheimer.

| Nº | Moléculas       | Espécie                     | Classe de Metabólito | Mecanismo de ação                                                                                                                                         | Atividade (IC 50) | Referência                                                 |
|----|-----------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------|
| 1  | Asiaticosídeo   | <i>Centellaasiatica</i>     | Triterpeno           | -Redução de oligômeros A $\beta$ .<br><br>-Redução de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$ | -                 | ZHANG et al., 2017                                         |
| 2  | Curcumina       | <i>Curcuma longa</i> L.     | Composto Fenólico    | -Proteção contra toxicidade A $\beta$<br>- Redução da peroxidação lipídica.<br>- Inibição de radicais livres (antioxidante)                               | >1.00 $\mu$ M     | REDDY et al., 2016; BUKHARI et al., 2014                   |
| 3  | Demetoxicurc    |                             |                      | - Regula NEP e diminui o acúmulo de A $\beta$ no hipocampo e no córtex na DA.                                                                             | 8.38 $\mu$ M      | CHEN et al., 2016; GANJI et al., 2013; BUOLAMWINI, 2002.   |
| 4  | umina           |                             |                      | - reduz a carga de placa A $\beta$ no cérebro com DA.                                                                                                     | 1.00 $\mu$ M      |                                                            |
| 5  | Bisdemetoxicurc |                             |                      | - Ação inibitória na formação de fibrilas A $\beta$                                                                                                       |                   |                                                            |
| 6  | Calebina-A      |                             |                      | - Efeito neuroprotetor                                                                                                                                    | 1.90 $\mu$ M      | XIE et al., 2014; JENSEM et al., 2007; GANJI et al., 2013. |
| 7  | Ginkgolídeo A   | <i>Ginkgo biloba</i>        |                      |                                                                                                                                                           | 1.70 $\mu$ M      | TCHANTCHOUA F et al., 2009; LIU et al., 2013.              |
| 8  | Ginkgolídeo B   |                             |                      |                                                                                                                                                           | >1.00 $\mu$ M     |                                                            |
| 9  | Ginkgolídeo C   |                             |                      | Restaurara os oligômeros $\beta$ -amilóide (também conhecidos como ADDL), perda sináptica e fosforilação da CREB. Antagoniza receptores GABA.             | >10 $\mu$ M       |                                                            |
| 10 | Bilobalide      |                             |                      |                                                                                                                                                           |                   |                                                            |
| 10 | Honokiol        | <i>Magnolia officinalis</i> | Lignanas fenólicas   | Atenuação da apoptose do neurônio primário                                                                                                                | 1.80 $\mu$ M      | WANG et al., 2017;                                         |

|    |                      |                          |                                                                                                                   |               |                                                                   |
|----|----------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------|
|    |                      |                          | induzida por oligômeros A $\beta$ através da regulação das funções mitocondriais na DA.                           |               | SCHÜHLY et al., 2009.                                             |
| 11 | Linalool             |                          | Redução de $\beta$ -amiloide extracelular                                                                         | 2.59 $\mu$ M  | SABOGAL-GUÁQUETA                                                  |
| 12 | Carvacrol            | Monoterpenoi de fenólico | - Inibição da enzima AChE                                                                                         | 1.06 $\mu$ M  | et al., 2015;                                                     |
| 13 | Luteolina            | Flavonoide               |                                                                                                                   | 1.15 $\mu$ M  | GOYAL; CHAUHAN., 2018;                                            |
| 14 | Ácido Rosmarínico    | Composto fenólico        | Inibição na agregação de A $\beta$ e bloqueio da formação de espécies intracelulares reativas de oxigênio (iROS). | 1.15 $\mu$ M  | et al.,2014; HE et al., 2009.                                     |
|    |                      |                          |                                                                                                                   |               | MESQUITA et al., 2019; KOUKOULI TSA et al 2007;HABT EMARIAM,2018. |
| 15 | Geraniol             | Monoterperno             | Inibição da enzima AChE                                                                                           | >1.00 $\mu$ M | PERRY et al., 2000                                                |
| 16 | Dihidrotanshinona    | Quinonas                 | Exercem efeitos anti-amilóide- $\beta$ , antioxidante,                                                            | 1.07 $\mu$ M  | ZHANG XZ et al., 2016;ORTA                                        |
| 17 | Tanshinona I         |                          | anti- apoptose ,                                                                                                  | 1.15 $\mu$ M  | R et al.,2014;                                                    |
| 18 | Metilenetanshinona   |                          | inibição da acetilcolinesteras e e anti-inflamatório.                                                             | 1.15 $\mu$ M  | PARK et al.,2012; LIU et al.,2013.                                |
| 19 | Criptotanshinona     |                          |                                                                                                                   | 2.14 $\mu$ M  |                                                                   |
| 20 | Ácido salvianólico A | Compostos fenólicos      |                                                                                                                   | 3,14 $\mu$ M  | HABTEMARIAM,2018;                                                 |
| 21 | Ácido salvianólico B |                          |                                                                                                                   | 4.10 $\mu$ M  | PAUDEL et al.,2018; SPERL et al.,2009.                            |

|    |                |                                   |              |                                                                                                                                                                                  |              |                                                 |
|----|----------------|-----------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------|
| 22 | Rosmariquinona |                                   | Diterpenoide |                                                                                                                                                                                  | 2.11 $\mu$ M | PARK et al., 2009.                              |
| 23 | Quercetina     | <i>Sanguisorba officinalis</i> L. | Flavonoide   | Ações sobre as correntes mediadas por receptores $\alpha_4$ , $\beta_2$ neuronais de acetilcolina nicotínica, receptores de serotonina e receptores de glutamato AMPA / cainato. | 1.08 $\mu$ M | TCHANTCHOUA F et al., 2009; JUNG et al., 2010.x |

---

### 3.5 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

O processo de descoberta e otimização de fármacos é difícil, demorado e com valor elevado, possuindo suas bases altamente ligadas a inovações científicas e tecnológicas de ponta, esse processo acontece em duas etapas: a descoberta que se inicia com a pesquisa básica de um novo composto, passando em seguida para os ensaios pré-clínicos, e por fim a fase de desenvolvimento conhecida como fase clínica (GUIDO; ADRICOPULO; OLIVA, 2010).

Na utilização de recursos para o desenvolvimento de fármacos, as origens moleculares em sistemas biológicos bem como a investigação da estrutura molecular se tornam de fundamental importância para a compreensão de características como força, afinidade e seletividade. Assim, ferramentas empregadas em química medicinal juntamente com as ferramentas biotecnológicas vêm ganhando destaque no planejamento de fármacos (GUIDO; ADRICOPULO; OLIVA, 2010).

Sistemas computacionais são ferramentas que auxiliam na seleção de produtos naturais com boa precisão para atividade biológica. Esses sistemas também podem ajudar no entendimento da atividade biológica desses produtos naturais. Os testes *in silico* podem ser empregados para sugerir propriedades de interação de substâncias ligantes à biomoléculas (alvos terapêuticos) que apresentam bom resultado *in silico* e

podem ser empregadas como importantes instrumentos em pesquisas experimentais (ATANASOV et al., 2015).

Em relação aos descritores moleculares de compostos, estes podem ser previstos através de sua estrutura 2D e 3D. Assim, esses descritores representam diferentes fontes de informação química (características) sobre moléculas incluindo geometria, aspectos eletrônicos, químico-quânticos, descritores físico-químicos e topológicos, entre outros. Estes descritores são importantes para a descrição quantitativa da estrutura molecular e a descoberta de modelos preditivos adequados (ESTRADA; MOLINA, 2001).

O QSAR, relação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica, emprega modelos apoiados em ligantes para modelagem das propriedades físicas e biológicas de compostos, representando ferramenta importante para o reconhecimento e elucidação de fármacos para serem utilizados no tratamento da doença de Alzheimer (KIM; HAN, 2018).

Um tipo de sistema computacional é a triagem virtual apoiada em farmacóforo, esse tipo de triagem tem demonstrado êxito. Sendo o padrão farmacofórico um arranjo 3D de propriedades físico-químicas, no qual configura as interações essenciais entre molécula e proteína alvo. O *docking* molecular também é outro sistema computacional utilizado para desvendar o funcionamento e simplificar a relação de estrutura atividade e produtos naturais (ATANASOV et al., 2015).

Portanto, considerando as propriedades das moléculas estudadas e suas interações com seu alvo farmacológico, os estudos *in silico* possibilitam valiosas previsões de atividade biológica, havendo diversos sistemas computacionais disponíveis para este propósito (ATANASOV et al., 2015).

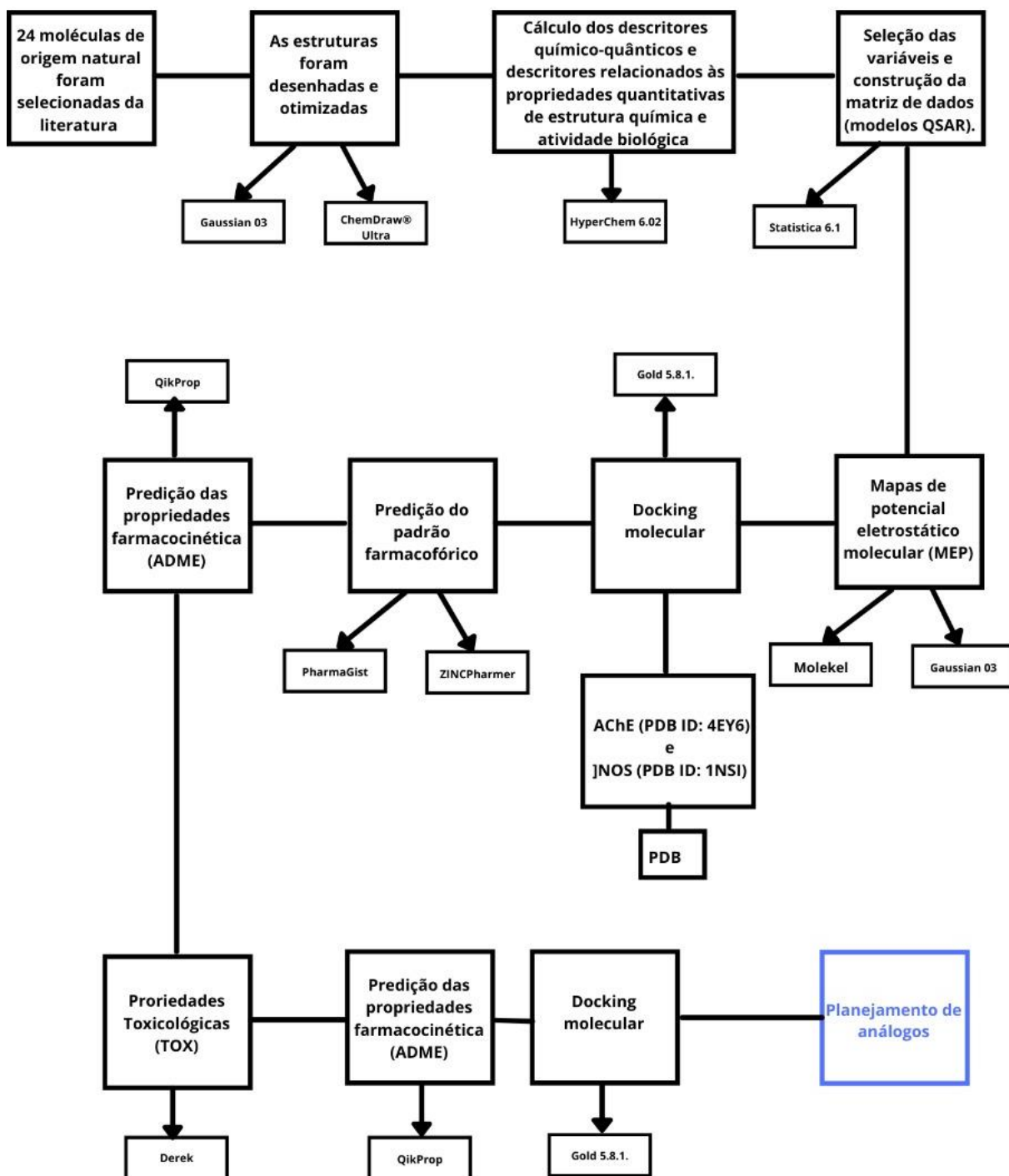
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

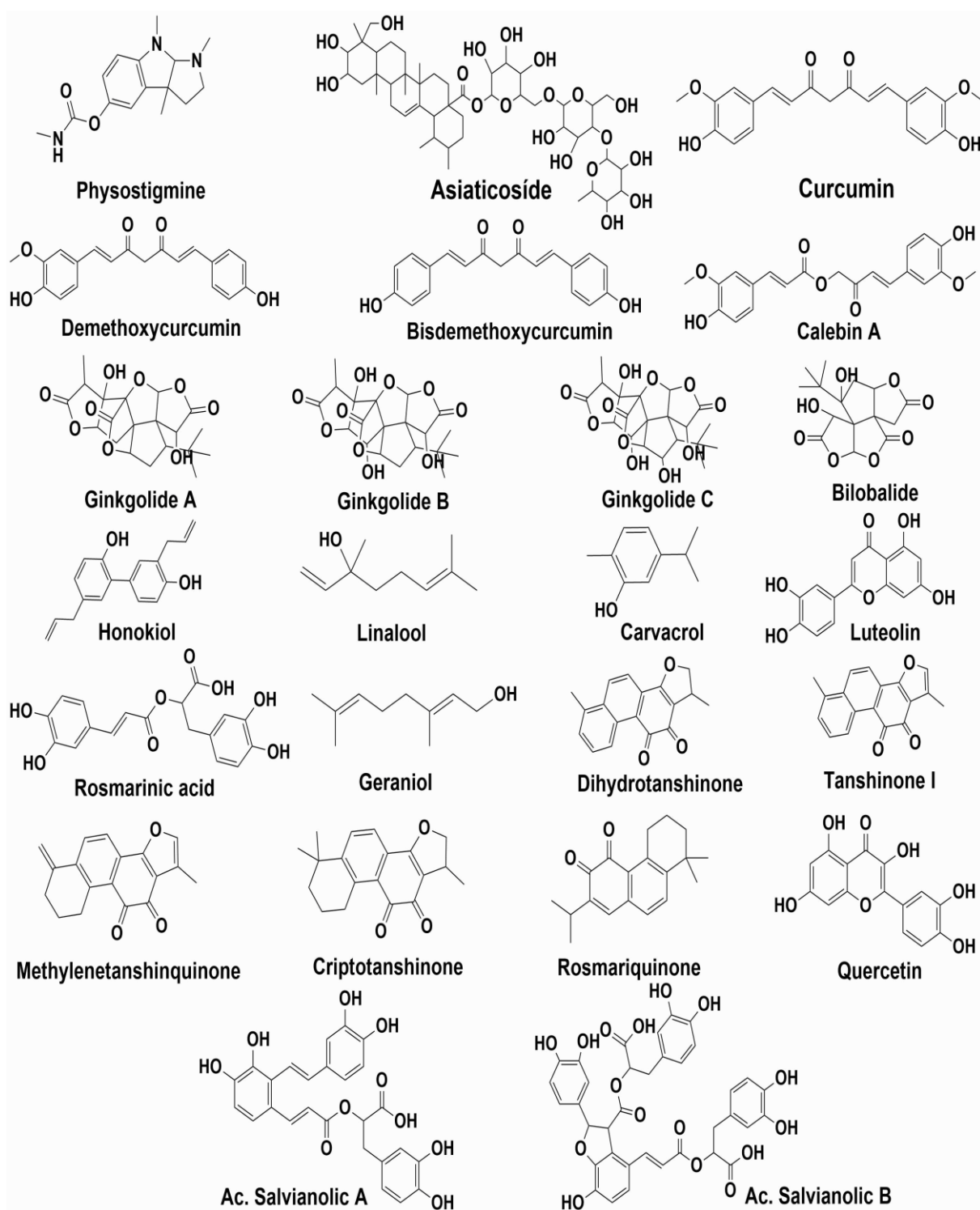
### 4.1 MODELAGEM MOLECULAR DOS PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS UTILIZANDO O MÉTODO COMPUTACIONAL VALIDADO

Inicialmente, 24 moléculas de origem natural foram selecionadas da literatura para o estudo: fisostigmina, Asiaticosídeo, curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, calebina-A, ginkgolídeo A, ginkgolídeo B, ginkgolídeo C, bilobalide, honokiol, linalool, carvacrol, luteolina, ácido rosmariníco, geraniol, dihidrotanshinona, tanshinona I, metilenetanshinona, criptotanshinona, ácido salvanólico A, ácido salvanólico B, rosmariquinona e quercetina. Todas estas estruturas são apresentadas na **(Figura 4)**. A estrutura química foi construída e otimizada completamente com o método e o conjunto de base validado no Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (PharMedChem) (OZELA et al., 2019), e o conjunto de base HF-6-31G implementado com o programa Gaussian 03 (FRISCH et al., 2004). A **(Figura 3)** apresenta o fluxograma com as etapas desta pesquisa.

**Figura 3** – Fluxograma com as etapas da pesquisa.



**Figura 4** – Estruturas químicas dos produtos naturais.



**Fonte:** ChemDraw® Ultra

## 4.2 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES MOLECULARES DOS PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS UTILIZANDO O MÉTODO COMPUTACIONAL VALIDADO

O cálculo dos descritores químico-quânticos e descritores relacionados às propriedades quantitativas de estrutura química e atividade biológica foi realizado utilizando os seguintes programas: Gaussian 03 (FRISCH et al., 2004), Molekel (FLUKIGER, 2002) e HyperChem 6.02 (CHEMPLUS, 2000).

### 4.2.1 Determinação das propriedades moleculares dos produtos naturais selecionados

#### 4.2.1.1 Descritores químico-quânticos

Nesse estudo, foram calculados os seguintes descritores químico-quânticos: energia do orbital molecular mais alto ocupado (HOMO), um nível abaixo da energia do orbital molecular mais alto ocupado (HOMO-1), energia do orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO), um nível acima da energia do orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO+1), diferença na energia entre HOMO e LUMO (GAP HOMO-LUMO), eletronegatividade de Mulliken ( $\chi$ ), dureza molecular ( $\eta$ ), moleza molecular ( $1/\eta$ ), carga nos átomos do grupo farmacofórico. Os orbitais de fronteiras (HOMO e LUMO) foram construídos e visualizados com auxílio do programa Molekel.

#### 4.2.1.2 Descritores relacionados às propriedades quantitativas de estrutura química e atividade biológica

Na matriz de dados foram incluídos descritores QSAR, ou seja, a área total da superfície (TSA), volume molecular (MV), refratividade molar (MR), molar polarizabilidade (MP), coeficiente de lipofilicidade (logP), massa molecular (MM) e energia de hidratação (HE) de acordo com o programa HyperChem 6.02. Os descritores moleculares foram selecionados para fornecer informações valiosas sobre a influência das características eletrônicas, estéricos, hidrofílicos e hidrofóbicos sobre atividade anti-Alzheimer.

#### 4.3 SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS E CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DE DADOS

Após a determinação de todos os descritores moleculares, foi possível construir uma matriz de dados para desenvolver a etapa da construção dos modelos QSAR. O objetivo de usar a matriz de dados padronizada é dar a cada variável um peso igual em termos matemáticos (MARINO et al., 2021).

As propriedades moleculares com maiores correlações em função da atividade foram selecionadas pela correlação de Pearson utilizando o programa Statistica 6.1 (STATISTICA, 2004). O objetivo final da análise foi avaliar os descritores que melhor se correlacionaram com a atividade biológica (IC50) das moléculas de produtos naturais.

#### 4.4 MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO MOLECULAR (MEP)

O MEP permite a utilização de uma análise qualitativa para localizar sítios reativos numa molécula, e determinar os papéis desempenhados por ambos os efeitos eletrônicos e estéricos (tamanho/forma) sobre a sua potência (POLITZER; MURRAY, 2002).

Os MEPs para os produtos naturais selecionados foram gerados a partir da carga atômica no método e nível de teoria validado para avaliar de forma qualitativa as regiões farmacofóricas dos produtos naturais estudados utilizando o programa Gaussian 03, e os resultados foram visualizados com o auxílio do programa Molekel (FLUKIGER, 2001).

#### 4.5 ESTUDO DE *DOCKING* MOLECULAR USANDO O PROGRAMA GOLD

Foram selecionadas as estruturas cristalográficas das enzimas AChE (PDB ID: 4EY6) e NOS (PDB ID: 1NSI) em complexo com os ligantes galantamina e L- ARG, respectivamente, obtidas a partir do Protein Data Bank (PDB) no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (BERMAN et al., 2000). Posteriormente, as estruturas foram preparadas adicionando átomos de hidrogênio e retirando as moléculas de água e inibidores. Logo após, utilizou-se o programa Gold 5.8.1. para investigar os modos de ligação entre as moléculas de origem natural e gerar um

conjunto de conformações para esses ligantes (VERDONK et al., 2003). As moléculas foram ancoradas dentro do sítio ativo das enzimas AChE e NOS, com as coordenadas  $x = -10,39$ ;  $y = -43,66$ ;  $z = 29,82$  raio de  $9,4 \text{ \AA}$  e  $x = 9,79$ ;  $y = 64,76$ ;  $z = 15,90$  raio de  $8,3 \text{ \AA}$ , respectivamente.

#### 4.6 PREDIÇÃO DO PADRÃO FARMACOFÓRICO

O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais das moléculas ligantes através dos quais se define os tipos de interação que os ligantes em comum fazem com o sítio receptor. Neste estudo, o padrão farmacofórico foi determinado a partir do servidor on-line PharmaGist (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>) (SCHNEIDMAN-DUHOVNY, 2008). O PharmaGist é uma das ferramentas gratuitas conhecidas para geração de farmacóforo baseada em ligante. Para encontrar características que são comuns a todos os compostos ativos, PharmaGist pega um ligante pivô em sua conformação “bioativa” e alinha todos os outros compostos a ele (KUTLUSHINA et al., 2018). Após, foi visualizado com auxílio do servidor on-line ZincPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu/>).

#### 4.7 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICA (ADME) E TOXICOLÓGICA (TOX) DOS PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS

As propriedades farmacocinéticas e a toxicidade dos compostos são uma das principais razões para que se encerre o desenvolvimento de candidatos a fármacos (GUPTA; MOHAN, 2014). Neste contexto, foram computadas algumas propriedades farmacocinéticas dos produtos naturais selecionados que incluíram o peso molecular, logP, logBB, porcentagem de absorção oral humana, atividade predita no sistema nervoso central, permeabilidade aparente em Caco-2, entre outras usando o módulo QikProp do software Schrödinger (SCHRÖDINGER, 2020).

O perfil de toxicidade dos produtos naturais selecionados foi avaliado usando o *software* DEREK. O DEREK é um sistema especialista baseado no conhecimento para a predição qualitativa de toxicidade. O DEREK realiza essas predições tendo como base uma série de regras, e cada regra descreve a relação entre uma

característica estrutural ou um toxicóforo e sua toxicidade associada (SANDERSON; EARNSHAW, 1991).

#### 4.8 PLANEJAMENTO DE ANÁLOGOS DOS PRODUTOS NATURAIS

A modelagem molecular entre subunidades estruturais de diferentes moléculas bioativas, utilizada como uma das principais ferramentas de planejamento estrutural, tem levado à descoberta de inúmeros ligantes, com propriedades múltiplas (DIAS et al., 2015).

Com a definição do farmacóforo e conhecendo o modo de interação fármaco-receptor, é possível propor alterações na estrutura dos produtos naturais para se obter substâncias com atividade multialvo. Com isso, os farmacóforos dos inibidores de AChE e NOS foram utilizados para o planejamento de uma série de análogos a partir do produto natural de cada classe que apresentou melhor resultado *in silico*.

### 5.1 MODELAGEM MOLECULAR E CÁLCULOS DE DESCRITORES

#### 5.1.1 Análise estatística dos descritores

A **Tabela 2** demonstra os resultados dos descritores químico-quânticos e descritores relacionados às propriedades quantitativas de estrutura química e atividade biológica e correlação de Pearson em que 1 representa uma correlação absoluta positiva, 0 para nenhuma correlação e -1 para correlação total negativa (MARINO et al., 2021). A maior correlação observada foi entre HOMO e GAP apresentando valor igual a 1, enquanto que a menor correlação observada foi entre energia de hidratação e HOMO-1 com valor de 0.6928.

Os orbitais de fronteira HOMO (energia do orbital molecular mais alto ocupado) e LUMO (energia do orbital molecular mais baixo desocupado) foram gerados e visualizados com auxílio do programa Molekel como apresentado pela **Figura 4 e 5**, respectivamente, sendo a fisostigmina utilizada como molécula referência, pois é o composto mais ativo com (IC<sub>50</sub> = 0,012 µM).

Uma categoria de descritores químico-quânticos bastante utilizados em estudos SAR/QSAR envolve o orbital molecular de maior energia (HOMO) e o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO), isso se deve ao fato deles fornecerem informações valiosas sobre reações químicas e na formação de diversos complexos de transferência de cargas (SANT'ANNA, 2002).

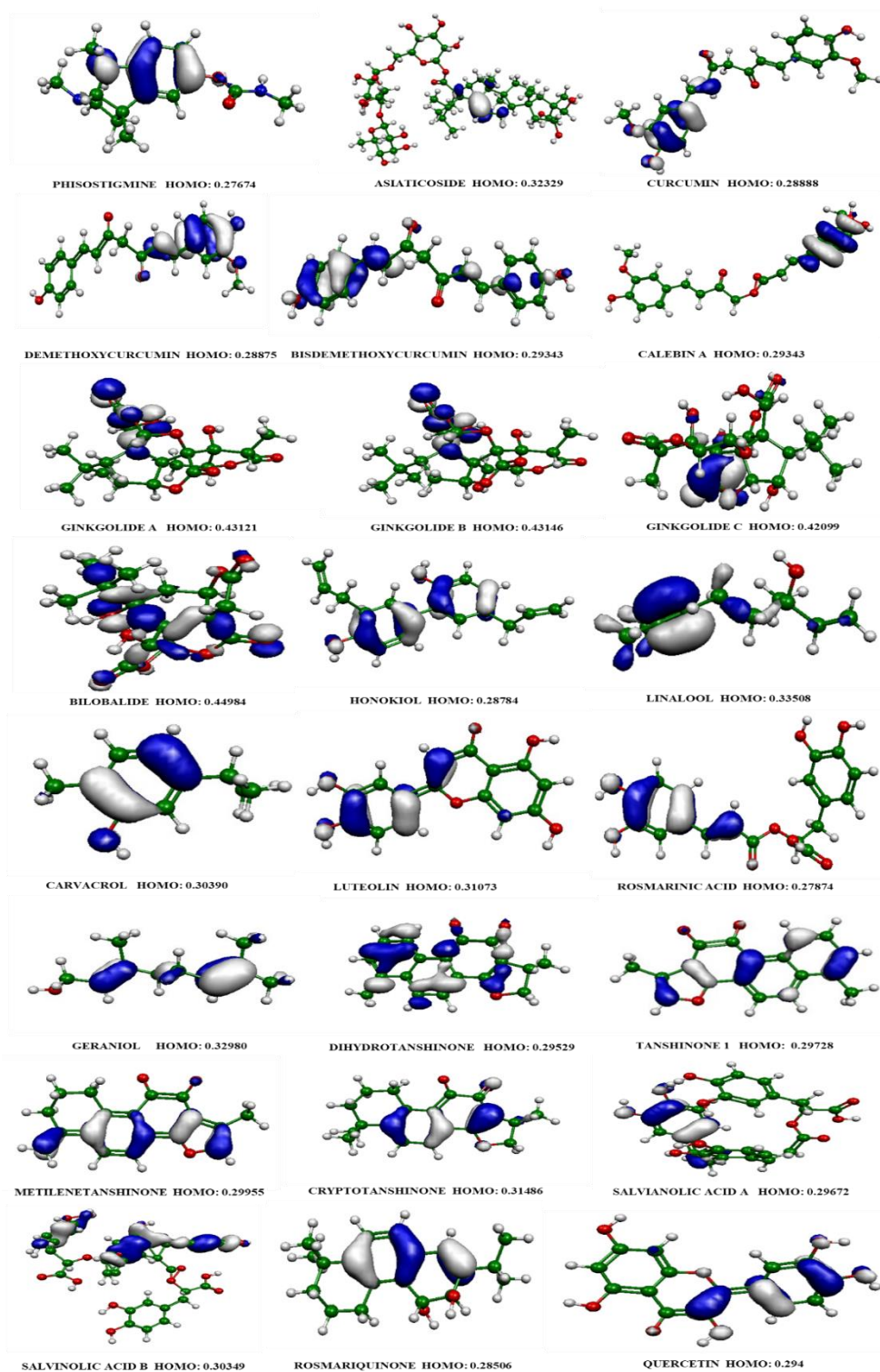
HOMO está relacionado com a capacidade doadora de elétrons e se refere ao potencial de ionização de uma molécula e sua reatividade como nucleófilo (ARROIO; HONORIO; SILVA, 2010). HOMO relaciona-se ao caráter elétron-doador de uma determinada molécula, ou seja, quanto maior a energia de HOMO, logo será maior a sua probabilidade de doar um elétron. Esta energia está diretamente relacionada com o potencial de ionização, caracterizando a função da molécula como um catalisador nucleofílico. Neste estudo, as moléculas que apresentaram os valores de HOMO mais aproximados da molécula de referência (fisostigmina = -0.2767) foram: metilenetanshinona (-0.2996), ácido salvianólico B (-0.2967), quercetina (-0.294),

tanshinona (-0.2973), dihidrotanshinona (-0.2953), calebina A (-0.293), bisdemetoxicurcumina (-0.2934), demetoxicurcumina (-0.2888), curcumina (-0.2889), honokiol (-0.2878), rosmariquinona (-0.2851). Estas moléculas apresentaram maiores valores de HOMO demonstrando possuírem maior potencial de ionização. Logo, a molécula rosmariquinona se apresenta com a maior probabilidade de ser um doador de elétrons semelhante ao composto de referência, seus glóbulos indicadores estão dispostos no anel pirocatecol e na interação  $\pi$  entre os carbonos próximo ao anel. Já as moléculas que apresentaram os menores valores de HOMO foram: bilobalide (-0.4498), ginkgolídeo A (-0.4312), ginkgolídeo B (-0.421), ginkgolídeo C (-0.421), asiaticosídeo (-0.3233), linalool (-0.3351), carvacrol (-0.3037), luteolina (-0.3107), ácido rosmariníco (-0.3032), geraniol (-0.3297), criptotanshinona (-0.3149), ácido salvianólico A (-0.3035). O valor da correlação de Pearson com o IC<sub>50</sub> para o HOMO e HOMO -1 foi: 0.0599 e 0.047, respectivamente, demonstrando que não houve correlação

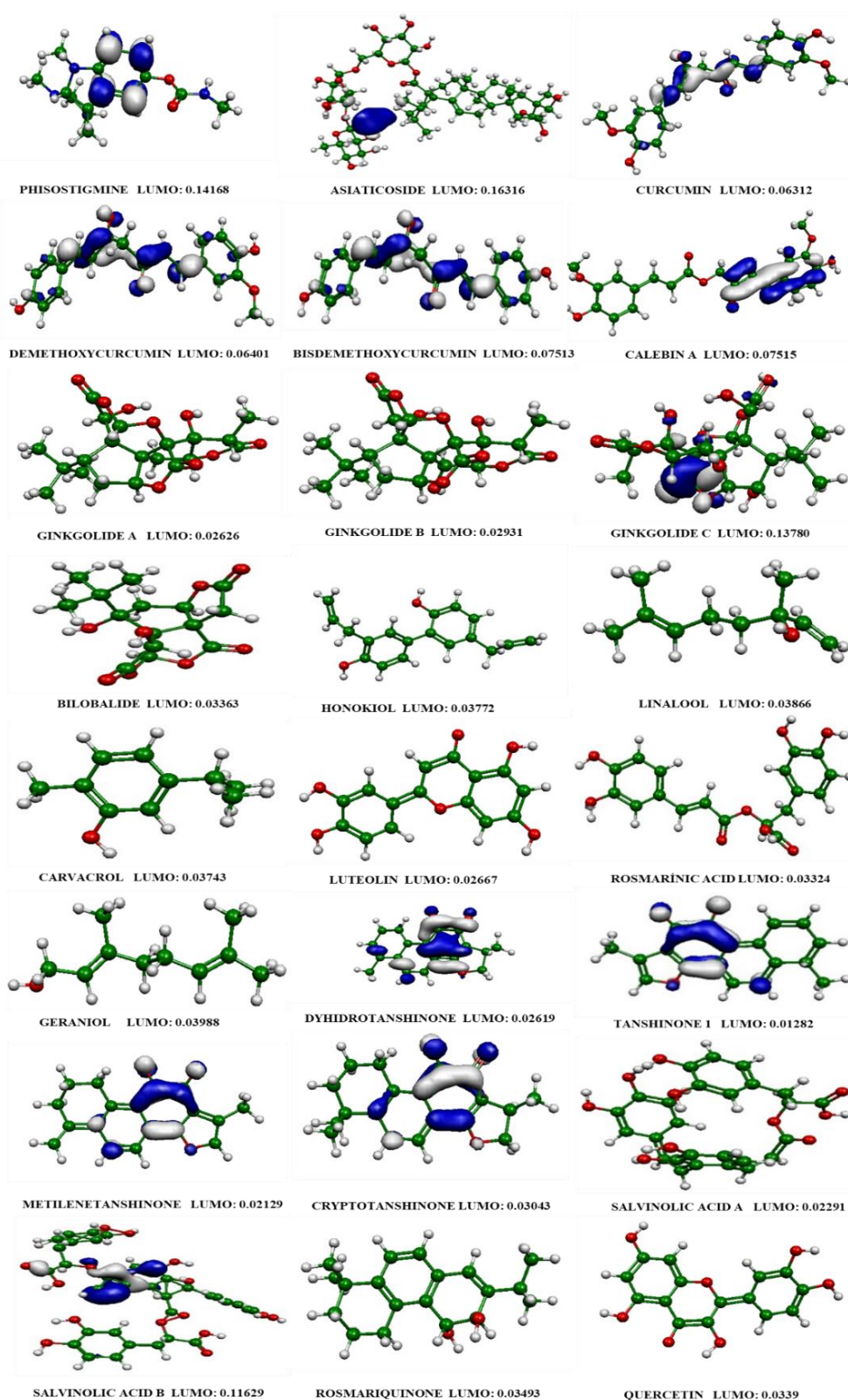
**Tabela 2** - Descritores moleculares e correlação de Pearson.

| Molécula             | S.A.<br>(approx) | S.A.<br>(Grid) | Vol.     | H.<br>Energy | Log P  | Refrac. | Polari.  | Mass    | EHOMO<br>(eV) | EHOMO – 1<br>(eV) | ELUMO<br>(eV) | ELUMO + 1<br>(eV) | Gap<br>(eV) | IC50 (nM) |
|----------------------|------------------|----------------|----------|--------------|--------|---------|----------|---------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|-------------|-----------|
| Fisostigmina         | 444.84           | 501.49         | 839.68   | 3.63         | 0.21   | 81.64   | 30.18    | 275.35  | -0.277        | -0.328            | 0.142         | 0.168             | -0.418      | 0.012     |
| Asiaticosídeo        | 918.16           | 1167.42        | 2300.36  | -40.21       | 2.33   | 232.55  | 94.02    | 959.13  | -0.323        | -0.379            | 0.163         | 0.184             | -0.486      | 2         |
| Curcumina            | 606.51           | 656.64         | 1073.44  | 18.05        | 0.14   | 111.16  | 38.95    | 368.39  | -0.289        | 0.29              | 0.063         | 0.085             | -0.352      | 1.1       |
| Demetoxicurcumina    | 573.2            | 616.84         | 1002.34  | 17.1         | 0.86   | 104.79  | 36.47    | 338.36  | -0.289        | -0.299            | 0.064         | 0.086             | -0.353      | 8.38      |
| Bisdemetoxicurcumina | 532.2            | 562.54         | 923.87   | 17.53        | 1.85   | 98.41   | 34       | 308.33  | -0.295        | -0.297            | 0.075         | 0.083             | -0.369      | 1         |
| Calebin-A            | 635.91           | 671.98         | 1110.48  | -18.58       | 3.37   | 105.83  | 39.58    | 384.39  | -0.293        | -0.297            | 0.075         | 0.083             | -0.369      | 10        |
| Ginkgolídeo A        | 384.02           | 513.84         | 928.14   | -8.34        | 0.53   | 90.17   | 36.91    | 408.4   | -0.431        | -0.444            | 0.026         | 0.037             | -0.457      | 1.9       |
| Ginkgolídeo B        | 384.03           | 519.51         | 944.18   | -9.34        | -0.09  | 91.38   | 37.55    | 424.4   | -0.431        | -0.443            | 0.029         | 0.037             | -0.461      | 1.7       |
| Ginkgolídeo C        | 378.23           | 521.69         | 951.01   | 10.8         | 1.85   | 98.41   | 34       | 308.33  | -0.421        | -0.438            | 0.138         | 0.151             | -0.559      | 1         |
| Bilobalide           | 327.25           | 427.66         | 750.07   | -10.31       | -0.01  | 69.99   | 28.65    | 326.3   | -0.45         | -0.455            | 0.034         | 0.04              | -0.483      | 10        |
| Honokiol             | 442.7            | 515.25         | 845.06   | -9.87        | 1.62   | 89.74   | 31.99    | 266.34  | -0.288        | -0.317            | 0.038         | 0.041             | -0.326      | 1.8       |
| Linalool             | 395.89           | 382.08         | 592.52   | 2.78         | 2.52   | 50.21   | 19.38    | 154.25  | 0.335         | -0.049            | 0.039         | 0.049             | -0.374      | 78.6      |
| Carvacrol            | 339.63           | 342.89         | 538.76   | 4.68         | 1.61   | 50.27   | 18.41    | 150.22  | -0.304        | -0.327            | 0.037         | 0.047             | -0.341      | 1.06      |
| Luteolina            | 319.56           | 433.74         | 721.39   | 23.39        | 3.11   | 81.49   | 27.9     | 286.24  | -31073        | -0.329            | 0.027         | 0.034             | -12859      | 1.15      |
| Ácido rosmarínico    | 471.45           | 563.71         | 953.05   | 34.31        | 1.68   | 97.73   | 34.91    | 360.32  | -0.303        | -0.308            | 0.033         | 0.035             | -0.336      | 1.15      |
| Geraniol             | 487.85           | 476.16         | 699.87   | 2.72         | 1.73   | 30.91   | 9.69     | 136.11  | -0.33         | -0.345            | 0.04          | 0.046             | -0.37       | 1         |
| Dihidrotanshinona    | 434.45           | 533.79         | 880.89   | 1.83         | 1.68   | 88.96   | 32.2     | 292.3   | -0.295        | -0.318            | 0.026         | 0.096             | -0.321      | 1.07      |
| Tanshinona I         | 361.88           | 446.93         | 756.26   | 3.05         | 0.81   | 85.34   | 37.17    | 276.29  | -0.297        | -0.319            | 0.013         | 0.035             | -0.31       | 1.15      |
| Metilenetanshinona   | 352.38           | 469.02         | 772.82   | -2.81        | 1.12   | 83.15   | 30.36    | 278.31  | -0.3          | -0.354            | 0.021         | 0.036             | -0.321      | 0.5       |
| Criptotanshinona     | 401.69           | 493.93         | 840.48   | 0.26         | 2.52   | 87.9    | 32.58    | 296.37  | -0.315        | -0.347            | 0.03          | 0.035             | -0.345      | 2.14      |
| Ácido salvianólico A | 515.69           | 671.45         | 1218.5   | 39.38        | 2.59   | 139.77  | 49.32    | 494.45  | -0.303        | -0.304            | 0.023         | 0.023             | -0.326      | 0.32      |
| Ácido salvianólico B | 1221.5           | 1028.62        | 1884.87  | 17.19        | 7.9    | 161.14  | 49.32    | 688.39  | -0.297        | -0.299            | 0.116         | 0.133             | -0.413      | 4.1       |
| Rosmariquinona       | 421.28           | 509.79         | 876.27   | 89.18        | 2.63   | 89.18   | 89.18    | 286.41  | -0.285        | -31894            | 0.035         | 0.034             | -0.32       | 2.11      |
| Quercetina           | 362.09           | 462.78         | 759.8    | -30.28       | -4.01  | 83.17   | 28.54    | 302.24  | -0.294        | -0.328            | 0.034         | 0.036             | -0.328      | 1.08      |
| S.A.(approx)         | 1                | 0.9171         | 0.8764   | -0.0595      | 0.6311 | 0.7463  | 0.4723   | 0.7606  | 0.176         | 0.0697            | 0.6018        | 0.5844            | 0.1759      | -0.0576   |
| S.A.(Grid)           |                  | 1              | 0.991097 | -0.1467      | 0.4793 | 0.9323  | 0.6717   | 0.9339  | 0.1471        | 0.0599            | 0.6435        | 0.626             | 0.1471      | -0.1776   |
| Vol.                 |                  |                | 1        | -0.1657      | 0.4556 | 0.9547  | 0.7095   | 0.9665  | 0.1348        | 0.0492            | 0.6476        | 0.6238            | 0.1348      | -0.1823   |
| H. Energy            |                  |                |          | 1            | 0.3319 | -0.1304 | 0.2501   | -0.2223 | -0.1415       | -0.6928           | -0.2025       | -0.2381           | -0.1415     | -0.0612   |
| Log P                |                  |                |          |              | 1      | 0.3402  | 0.2535   | 0.3294  | -0.1592       | -0.1084           | 0.2662        | 0.247             | -0.1592     | 0.1196    |
| Refrac.              |                  |                |          |              |        | 1       | 0.766499 | 0.9624  | 0.0786        | 0.0368            | 0.581301      | 0.5625            | 0.0786      | -0.2339   |
| Polariz              |                  |                |          |              |        |         | 1        | 0.7238  | 0.1096        | -0.5864           | 0.374702      | 0.3316            | 0.1096      | -0.1968   |
| Mass                 |                  |                |          |              |        |         |          | 1       | 0.0771        | 0.0769            | 0.5488        | 0.5204            | 0.0771      | -0.2152   |
| Homo                 |                  |                |          |              |        |         |          |         | 1             | -0.0435           | 0.1408        | 0.1545            | 1           | 0.0599    |
| Homo -1              |                  |                |          |              |        |         |          |         |               | 1                 | 0.1007        | 0.1545            | -0.0435     | 0.047     |
| Lumo                 |                  |                |          |              |        |         |          |         |               |                   | 1             | 0.9535            | 0.1408      | -0.0691   |
| Lumo + 1             |                  |                |          |              |        |         |          |         |               |                   |               | 1                 | 0.1545      | -0.0798   |
| Gap                  |                  |                |          |              |        |         |          |         |               |                   |               |                   | 1           | 0.0599    |
| IC50                 |                  |                |          |              |        |         |          |         |               |                   |               |                   |             | 1         |

**Figura 5** - Apresentação dos orbitais HOMO para as moléculas de produtos naturais.



**Figura 6** - Apresentação dos orbitais LUMO para as moléculas de produtos naturais.



A energia de LUMO está relacionada com a capacidade aceptora de elétrons e quanto menor a sua energia neste orbital será menor resistência do composto em aceitar elétrons, este tipo de descritor está relacionado com a capacidade da molécula de ser mais susceptível ou não a um ataque nucleofílico (ARROIO; HONORIO; SILVA, 2010).

As moléculas que apresentaram valores de LUMO mais aproximados da molécula referência (fisostigmina: 0.1416) foram: ginkgolídeo C (0.1378), tanshinona (0.0128), ácido salvianólico B (0.1169) e asiaticoside (0.1632). Logo o composto que mais se assemelha a fisostigmina e seu padrão de aceitação de elétrons é a ginkgolídeo C, entretanto a molécula entre essas citadas que é mais susceptível a aceitar um elétron seria a ácido salvianólico B apresentando seu glóbulo de indicação na região de dois, dos três, anéis catecol. O valor da correlação de Pearson com o IC50 para LUMO e LUMO +1 foi : -0.0691 e -0.0798, respectivamente, demonstrando uma correlação negativa.

A diferença de energias de HOMO e LUMO denomina-se GAP (HOMO-LUMO) é um importante indicador de estabilidade molecular e reatividade química, que representa a diferença entre as energias desses orbitais. Alto valor de GAP indica alta estabilidade da molécula, no sentido de baixa reatividade nas reações químicas, enquanto moléculas com baixo valor de GAP são mais reativas (ZHANG; MUSGRAVE, 2007).

O GAP de energia da molécula mostra claramente a interação de transferência de carga envolvendo grupos doadores e aceptadores. Se a diferença de energia HOMO-LUMO é pequena, então, a molécula é definida como suave, isto é, é altamente polarizável e tem alta reatividade química, ao passo que se o GAP de energia for grande, a molécula pode ser definida como dura, ou seja, menos reativa (SIVAJEYANTHI, 2019).

As moléculas que apresentaram valor de GAP máximo foram: luteolina (-1286) ginkgolídeo A (-0,4575), ginkgolídeo B (-0,4608), ginkgolídeo C (-0,5588 e bilobalide (-0,4835), indicando que são mais estáveis possuindo baixa reatividade. Já as moléculas com valor de GAP mínimo foram: rosmariquinona acid (-0,3364), tanshinona I (-0,3101), metilenetanshinona (-0,3209) e honokiol (-0,3256), apresentando maior reatividade. A molécula com GAP mais semelhante ao composto de referência (-0,4185) é a ginkgolídeo A, podendo haver sua estabilidade química semelhante a fisostigmina no

momento de formar um complexo de transferência de carga. O valor da correlação de Pearson com o IC50 para GAP foi: 0.0599 indicando que não houve correlação.

A lipofilicidade define-se sendo a afinidade de um composto por meios orgânicos, sendo repulsivos a meios mais aquosos, que sejam mais polares. O valor de LogP traduz em valor numérico esta afinidade, e tendo em vista que o organismo animal tem um determinado equilíbrio entre essas polaridades do meio, é necessário para uma molécula ter uma boa absorção e atividade o valor de LogP ser equilibrado, nem muito alto para não ficar ligado fixamente a nenhuma proteína carreadora ou mucosas e não muito baixo para que não seja facilmente excretado, por exemplo (DORWALD, 2012; GODYŃ et al, 2017). Portanto, as moléculas foram avaliadas neste quesito e o resultado gerado através da correlação de Pearson demonstrou que este descritor e o IC50 possuem correlação positiva entre si (0.11). Estes resultados de LogP foram definidos na faixa entre -4,01 (quercetina) e 7,9 (ácido salvianólico), com uma média de todos os valores igual a 1,61. Isto corrobora para a maioria destas moléculas serem boas candidatas a fármacos orais, levando-se em consideração o que é definido pelas regras de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997). As moléculas com valores de LogP mais aproximados da molécula referência (fisostigmina: 0.21) foram: criptotanshinona (0.26), curcumina (0.14), ginkgolídeos A (0.53) e demetoxicurcumina (0.86).

A polarizabilidade molecular descreve a tendência de uma molécula de mudar seu momento de dipolo em resposta a um campo elétrico aplicado (WILKINS et al., 2019). O valor da correlação de Pearson com o IC50 para Polarizabilidade foi de -0.1968, demonstrando que houve correlação negativa. As moléculas com valores de polarizabilidade mais aproximados da molécula de referência (fisostigmina: 30.18) foram: metilenetanshinona (30.36), honokiol (31.9), criptotanshinona (32.58), dihidrotanshinona (32.2), bisdemetoxicurcumina (34), ginkgolídeo C (34), ácido rosmariníco (34.91).

O volume da superfície molecular compreende o volume intrínseco de átomos de proteína denominado volume de van der Waals (CHEN; MAKHATADZE, 2015). O valor da correlação de Pearson com o IC50 para o volume da superfície foi de -0.1823, demonstrando que houve correlação negativa. As moléculas que apresentaram valores de volume de superfície molecular mais aproximados da molécula de referência

(fisostigmina: 839.68) foram: honokiol (845.06), dihidrotanshinona (880.09), criptotanshinona (840.48) e rosmariquinona (876.27).

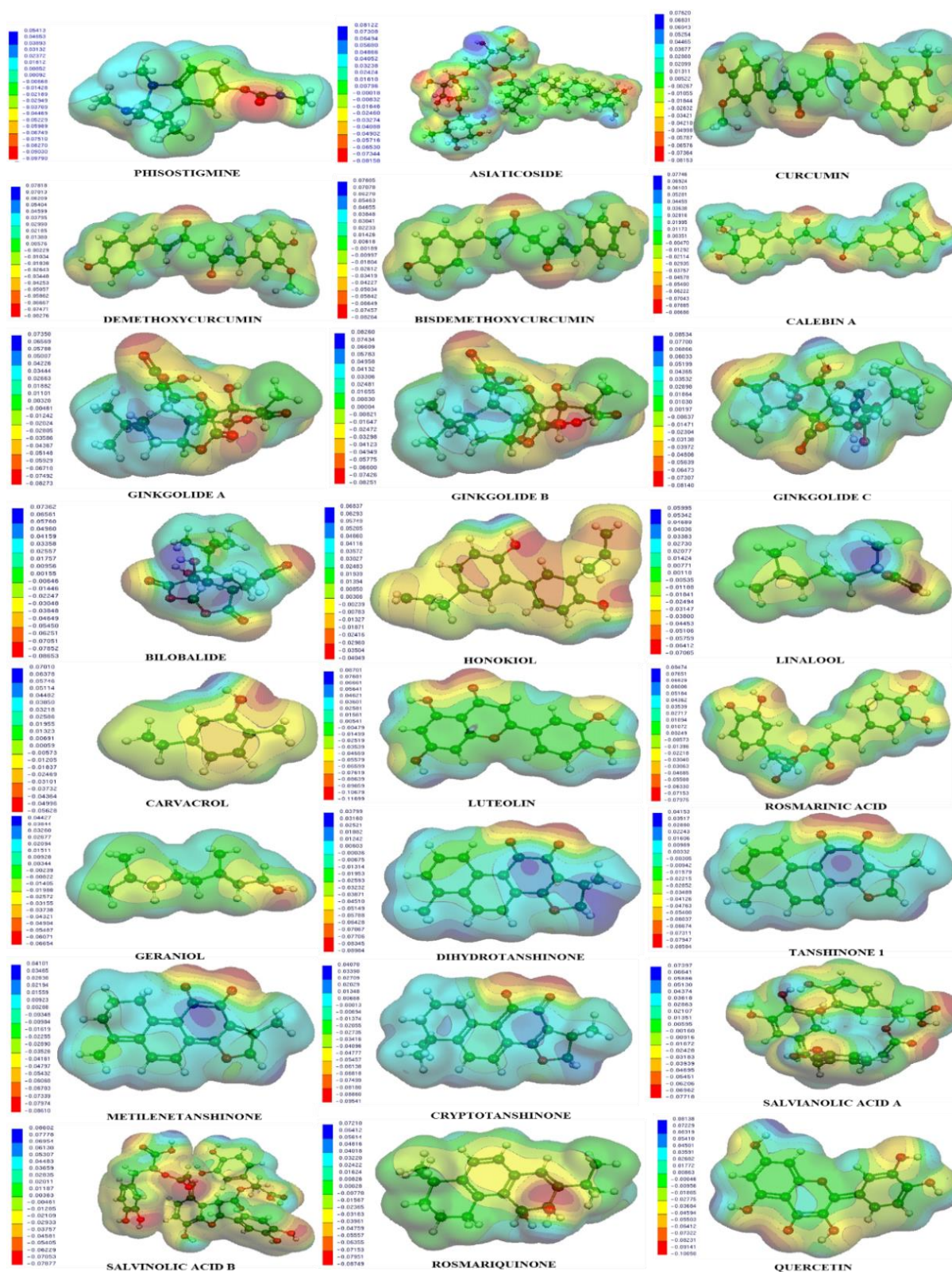
## 5.2 MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO MOLECULAR (MEPs)

Os mapas de potencial eletrostático (MEPs) fornecem informações importantes para analisar e prever o comportamento reativo de uma molécula (POLITZER et al., 1985).

O MEP é baseado no fato de que exibe simultaneamente o tamanho molecular, a forma, bem como a região do potencial eletrostático positivo, negativo e neutro em termos de graduação de cor (ALAM; PARK, 2018). O potencial eletrostático onde existe uma maior densidade eletrônica é representada por cores quentes como o vermelho e amarelo, já uma menor densidade eletrônica é representada por cores frias como azul e verde. Assim, regiões no MEP que apresentam tons mais frios (azul, verde) apresentam carga parcial positiva e regiões que apresentam tons mais quentes (vermelho, amarelo) apresentam cargas parciais negativas (RAMACHANDRAN et al., 2008).

Estas regiões de cargas parciais negativas possuem uma maior probabilidade de realizarem um ataque nucleofílico, já a região com maiores probabilidades de sofrerem ataques nucleofílicos são as regiões mais frias (CUNHA et al., 2015). A representação de visualização do MEP de cada molécula estudada está presente na figura 4.

Figura 7 - Apresentação visual dos MEP'S.



Verificou-se que o potencial eletrostático molecular negativo é distribuído especificamente nas regiões estruturais onde há átomos de oxigênio, presente bastante em grupos de carboxila (C-OH) e carboxilas (C=O). Os valores maior e menor para potencial eletrostático negativo foram de -0,11 e -0,04, para as moléculas luteolina e honokiol, respectivamente. Sendo a molécula que mais se assemelhou com a fisostigmina (-0,09) foi a criptotanshinona com seu potencial eletrostático negativo se igualando a -0,0954.

Poucas moléculas apresentaram potencial eletrostático positivo, devido a grande quantidade de oxigênio presente na maioria delas. As que apresentaram potencial eletrostático positivo possuem muitas metilas (CH<sub>3</sub>) em suas estruturas e algumas moléculas apresentam esse potencial em seus anéis aromáticos. Os valores menor e maior para o potencial eletrostático positivo foram de 0,0379 e 0,0871 para dihidrotanshinona e luteolina, respectivamente. Entretanto a molécula que obteve maior semelhança com a fisostigmina (0,0542) foi o geraniol com seu potencial eletrostático positivo se igualando a 0,0502.

A porção da fisostigmina com nuvens eletrônicas negativas se encontram potencialmente no grupamento carbamato, onde será a provável região onde a molécula fará ataques nucleofílicos. Em contrapartida a região provável de centro eletrofílico se determinam nas aminas cíclicas do lado oposto ao carbamato, o que deixa a molécula com dois polos parciais bem distintos. Corroborando com o trabalho de Nascimento (2009), onde seus resultados apresentaram uma concentração eletrônica na região onde há átomos de oxigênio. Os compostos que mais se assemelham com essa característica da estrutura referência são: linalool, luteolina, geraniol, dihidrotanshinona, tanshinona, metilenetanshinona e criptotanshinona, sendo o restante das moléculas estudadas mais heterogêneas em relação a densidade eletrônica em torno de sua estrutura, justamente por apresentarem mais carboxilas, carbonilas e hidroxilas.

### 5.3 DERIVAÇÃO DO FARMACÓFORO

Um farmacóforo descreve o arranjo espacial das características essenciais de uma interação. Os compostos que correspondem a um farmacóforo bem definido servem como compostos líderes potenciais para a descoberta de fármacos (KOESD; CAMACHO, 2012). Existem dois tipos de farmacóforos: farmacóforos baseados em estrutura derivados diretamente de estruturas de raios-X de complexos proteína-ligante e farmacóforos baseados em ligantes derivados de estruturas de compostos ativos conhecidos (KUTLUSHINA et al., 2018).

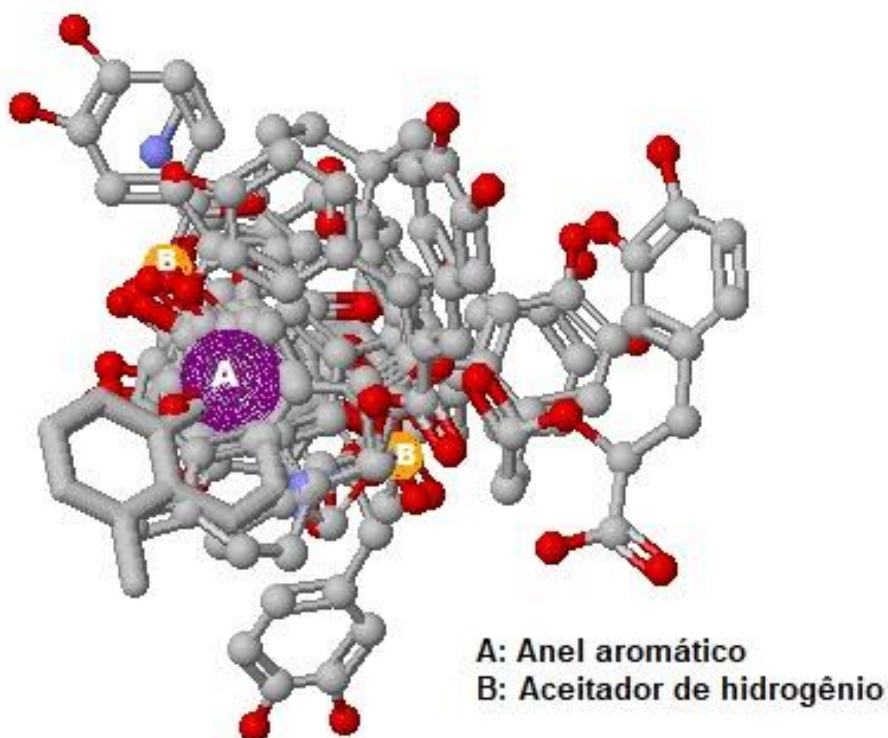
Nesse estudo, o resultado com maior número de moléculas alinhadas e que obteve a maior pontuação de score (20,785) pode ser observado na **Figura 8**, referente a 9 moléculas alinhadas contendo três grupos farmacofóricos: dois aceitadores de ligação de hidrogênio e um anel aromático. As moléculas alinhadas foram: fisostigmina, ácido rosmariníco, ácido salvianólico A, ácido salvianólico B, criptotanshinona, luteolina, metilenetanshinona, quercetina e tanshinona, sendo a molécula fisostigmina utilizada como molécula pivô para geração do melhor modelo farmacofórico.

Em um estudo de Jiang e Gao (2018), foram criados modelos farmacofóricos 3D QSAR para potenciais inibidores de AChE, os modelos foram gerados utilizando programa Discovery Studio usando um conjunto de flavonoides, observou-se que as características do melhor modelo farmacofórico incluíram dois aceitadores de ligação de hidrogênio e três hidrofóbicos.

Pang et al. (2017) avaliaram novos inibidores de acetilcolinesterase e butilcolinesterase como potenciais agentes da Doença de Alzheimer usando farmacóforo, 3D-QSAR e *docking* molecular, onde a melhor hipótese de farmacóforo consistiu em dois aceitadores de hidrogênio, dois anéis aromáticos e uma característica hidrofóbica.

Xu et al. (2014) montaram um modelo de farmacóforo 3D para inibição de Óxido Nítrico Sintase Neuronal humana (nNOS) por meio de uma combinação de modelagem de farmacóforo, COMFA, triagem virtual e estudos de *docking*, o melhor modelo incluiu 7 características de farmacóforo: três hidrofóbicas, um átomo doador, um átomo aceitador e dois nitrogênios positivos.

**Figura 8** - Modelo farmacofórico construído com auxílio do Webservidor Pharmagist.



**Fonte:** ZincPharmer

#### 5.4 DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular é um método computacional intensivo e proeminente no processo de descobrimento de fármacos. O benefício do *docking* é identificar o modo de ligação dos ligantes no sítio de ligação da enzima ou receptor através de interações-chave específicas e de prever a afinidade de ligação entre os complexos proteína-ligante (GUPTA; MOHAN, 2014).

O programa GOLD utiliza o algoritmo genético para fins de experimentos de *docking* flexível de ligantes dentro de sítios de ligação de proteínas. Uma população de soluções potenciais (isto é, possíveis orientações docadas dos ligantes) é configurada de forma aleatória (VERDONK et al., 2003). Cada membro da população é codificado como um cromossomo que contém as informações sobre o mapeamento de interações

de hidrogênio de átomos do ligante para (complementares) interações de hidrogênio de átomos da proteína, mapeamento de pontos hidrofóbicos no ligante para pontos hidrofóbicos na proteína e a conformação em torno das ligações flexíveis do ligante e grupos hidroxílicos da proteína. Para predizer como uma molécula pequena irá ligar-se a uma proteína é difícil e nenhum programa pode garantir sucesso. A próxima etapa realizada é medir a maior precisão possível da confiabilidade do programa, isto é, a chance de que ele vai fazer uma boa predição em uma determinada instância. Por esse motivo, o GOLD tem sido testado com um grande número de complexos extraídos do PDB. A conclusão geral desses testes foi que as soluções melhor classificadas pelo GOLD estavam corretas em 70-80% dos casos (VERDONK et al., 2003).

Após o procedimento de preparação das estruturas para o experimento, onde foi adicionado átomos de hidrogênio e retirado as moléculas de água e inibidores. Realizou-se a validação desses resultados por meio do cálculo RSMD (Root-Mean-Square Deviation) com os seguintes valores: 0,240 Å para AChE (PDB ID: 4EY6) e 1,769 Å para NOS (PDB ID: 1NSI).

Ao analisar os valores de score, as moléculas que apresentaram as melhores poses pela enzima AChE foram: ácido salvanólico A (101,76), ácido rosmariníco (92,20), calebina-A (90,75), curcumina (91,10), ácido salvanólico B (87,37), demetoxicurcumina (87,44), quecetina (82,14) e bisdemetoxicurcumina (80,73). Já para a enzima NOS foram as seguintes moléculas: ácido salvanólico B (99,27), calebina-A (89,26), demetoxicurcumina (80,93), tanshinona I (79,62), ácido rosmariníco (78,69), dihidrotanshinona (78,67), curcumina (78,56), asiaticosideo (76,30), bisdemetoxicurcumina (76,21), ácido salvanólico A (74,04) e metilenetanshinona (74,14). Todas as interações destas moléculas com a enzima AChE estão visíveis na **Tabela 5 e 4** e as interações com a enzima NOS estão detalhadas na **Tabela 3 e 6**.

Foi calculado o *docking* molecular para o ligante complexado na enzima AChE e NOS, para comparar com os resultados encontrados, observou-se que o ligante complexado na enzima AChE, fez três interações hidrofóbicas com o aminoácido Trp86 e uma com His447, com relação às interações de hidrogênio, ocorreu uma para cada um dos aminoácidos: His447, Asp74 e Tyr124. Já para o ligante complexado na enzima NOS, não houve interações hidrofóbicas. Com relação às interações de hidrogênio,

houveram duas interações com o aminoácido Ser203 e uma para cada um dos aminoácidos: His447, Asp74 e Tyr124.

Foi feita, também, a análise da estrutura cristalográfica da AChE humana em complexo com galantamina e estrutura cristalográfica da NOS em complexo com L- ARG. Na análise da estrutura da AChE, observou-se três interações hidrofóbicas com o aminoácido TRP86 e uma hidrofóbica com o aminoácido His447. Com relação às interações de hidrogênio, foi possível observar duas interações com o aminoácido Ser203, uma com His447, uma com Asp74 e uma com Tyr124. Já na análise da estrutura da NOS, observou-se três interações com o aminoácido Glu377 e uma com o aminoácido Tyr373.

Na análise das interações hidrofóbicas ocorridas entre as moléculas estudadas e os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico, a partir da simulação de *docking* com a AChE, observou-se que demetoxicurcumina, ginkgolídeo A , ginkgolídeo B, ginkgolídeo C, ácido rosmariníco, criptotanshinona e fisostigmina interagiram com o resíduo de aminoácido His447. Já asiaticosideo, ginkgolídeo A, ginkgolídeo B e criptotanshinona interagiram com aminoácido Tyr72.

A maioria das moléculas estudadas apresentou interações com o aminoácido Trp86, foram elas: demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, calebina-A, ginkgolídeo A, ginkgolídeo B e ginkgolídeo C, linalool, carvacrol, luteolina, dihidrotanshinona, tanshinona I, criptotanshinona, ácido salvianólico A e B, rosmariquinona, quercetina, metilenetanshinona e fisostigmina.

Houve, também, interação entre o aminoácido Tyr124 e ginkgolídeo A, ginkgolídeo B, honokiol, ácido rosmariníco, geraniol, dihidrotanshinona, tanshinona I, metilenetanshinona, criptotanshinona, ácido salvianólico A e B. Já o resíduo Trp286 interagiu com asiaticosideo, curcumina, demetoxicurcumina , calebina-A, ácido rosmariníco, ácido salvianólico A e B, observou-se que asiaticosideo, bisdemetoxicurcumina, honokiol, geraniol e fisostigmina interagiram com o resíduo de aminoácido Tyr341.

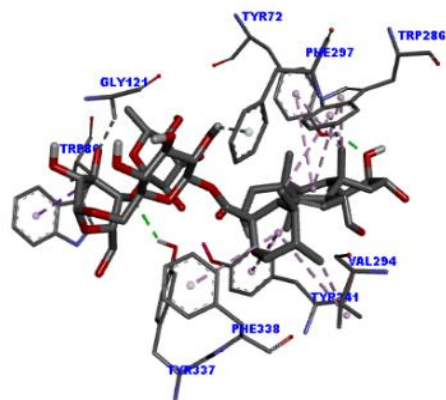
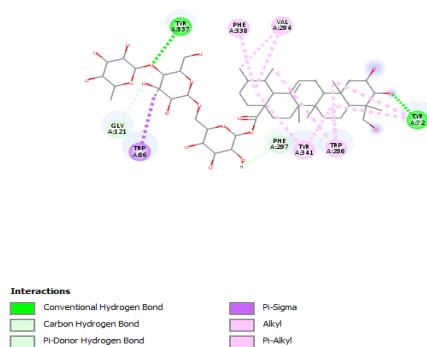
**Tabela 3** – Análise das interações intermoleculares entre a enzima NOS e o ligante cristalográfico e dos resultados de *Docking* Molecular entre a enzima NOS e as 24 moléculas de produtos naturais o ligante do complexo.

| Moléculas            | TIPO DE INTERAÇÃO |         |        |        |        | OUTRAS INFORMAÇÕES |       |        |       |
|----------------------|-------------------|---------|--------|--------|--------|--------------------|-------|--------|-------|
|                      | INTERAÇÃO DE H    |         |        |        |        | Total              | Score | Outros | Geral |
|                      | Gln 263           | Tyr 373 | Glu377 | Asp382 | Arg388 |                    |       |        |       |
| Estrut.complexada    | -                 | 1       | 3      | -      | -      | 4                  | -     | 8      | 12    |
| Ligante              | 1                 | -       | 3      | 1      | -      | 5                  | 47.04 | 11     | 16    |
| Fisostigmina         | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 21.15 | 11     | 11    |
| Asiaticosídeo        | -                 | -       | 1      | -      | 1      | 2                  | 76.3  | 16     | 18    |
| Curcumina            | 2                 | -       | -      | -      | -      |                    | 78.56 | 10     | 12    |
| Demetoxicurcumina    | -                 | -       | -      | -      | -      |                    | 80.93 | 6      | 6     |
| Bisdemetoxicurcumina | -                 | -       | -      | -      | -      |                    | 76.21 | 9      | 9     |
| Calebina-A           | 2                 | -       | -      | -      | -      | 2                  | 89.26 | 7      | 9     |
| Ginkgolídeo A        | 1                 | -       | -      | -      | -      | 1                  | 34.12 | 5      | 6     |
| Ginkgolídeo B        | 1                 | -       | -      | -      | -      | 1                  | 37.87 | 8      | 9     |
| Ginkgolídeo C        | 1                 | -       | -      | -      | -      | 1                  | 44.9  | 6      | 7     |
| Bilobalide           |                   |         |        |        |        |                    | 39.53 | 4      | 4     |
| Honokiol             | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 75.59 | 11     | 11    |
| Linalool             | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 48.81 | 13     | 13    |
| Carvacrol            |                   |         |        |        |        |                    | 59.09 | 12     | 12    |
| Luteolina            | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 74.36 | 11     | 11    |
| Ácido rosmarínico    | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 78.69 | 11     | 11    |
| Geraniol             | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 52.36 | 11     | 11    |
| Dihidrotanshinona    | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 78.69 | 18     | 18    |
| Tanshinona I         | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 79.62 | 21     | 21    |
| Metilenetanshinona   | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 74.14 | 18     | 18    |
| Criptotanshinona     | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 47.29 | 8      | 8     |
| Ácido salvianólico A | -                 | -       | -      | -      | 1      | 1                  | 74.04 | 3      | 4     |
| Ácido salvianólico B | 1                 | -       | -      | -      | -      | 1                  | 99.27 | 13     | 14    |
| Rosmariquinona       | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 56.99 | 12     | 12    |
| Quercetina           | -                 | -       | -      | -      | -      | -                  | 64.89 | 10     | 10    |

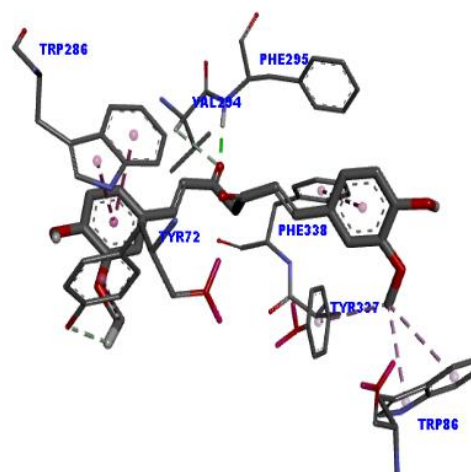
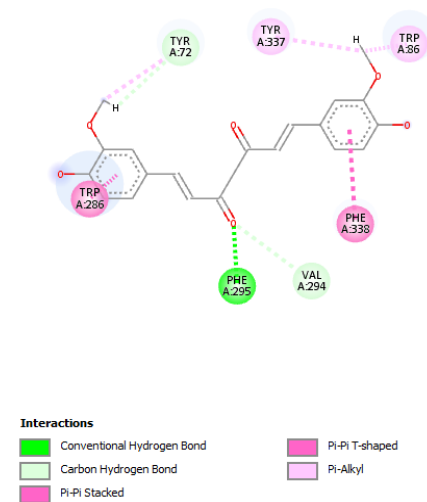
**Tabela 4** – Apresentação das moléculas selecionadas para o estudo de *docking* molecular entre AChE e as moléculas de produtos naturais.

| MOLÉCULAS    | 2D | 3D |
|--------------|----|----|
| AChE complex |    |    |
| Ligante      |    |    |
| Fisostigmina |    |    |

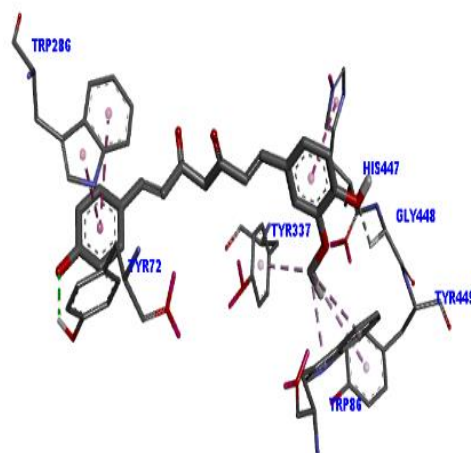
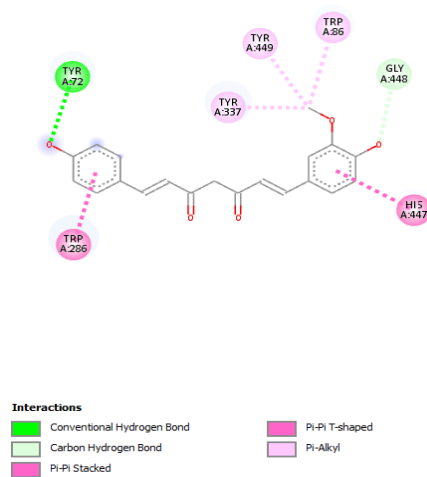
Asiaticosídeo



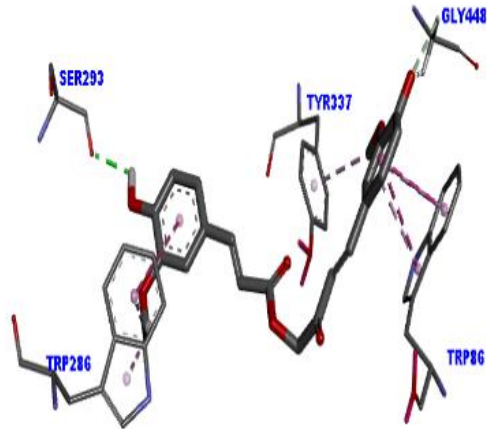
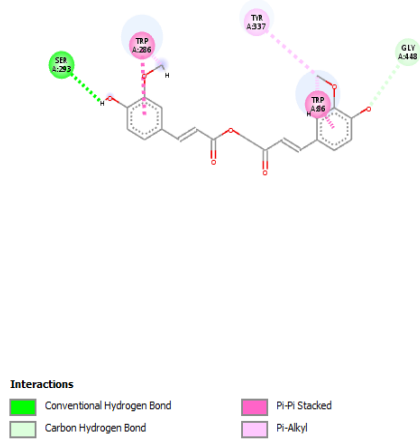
## Curcumina



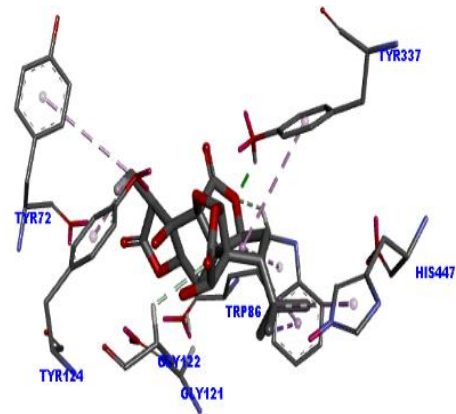
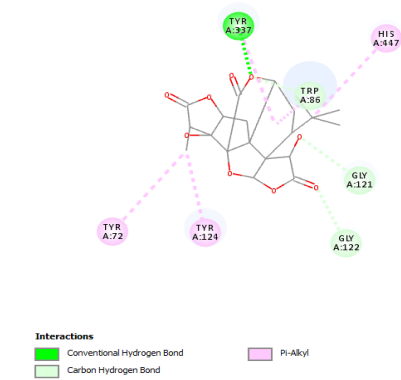
Demetoxicurcu  
mina



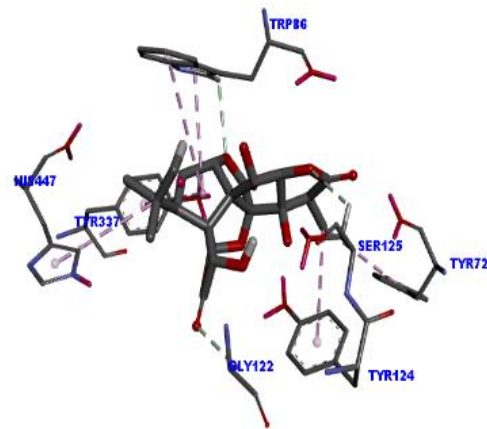
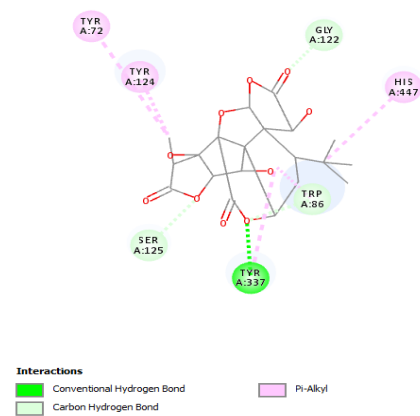
Bisdemetoxicu  
rcumina



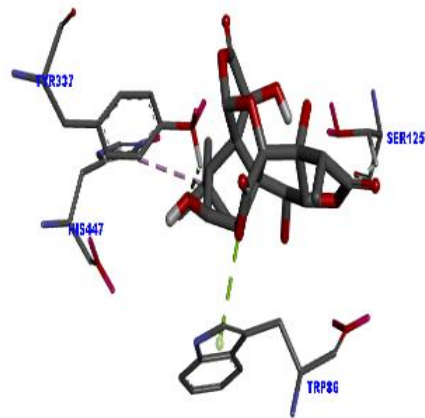
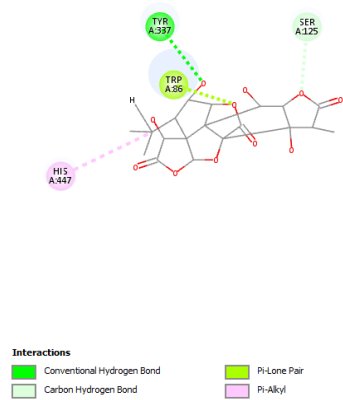
Calebina-A



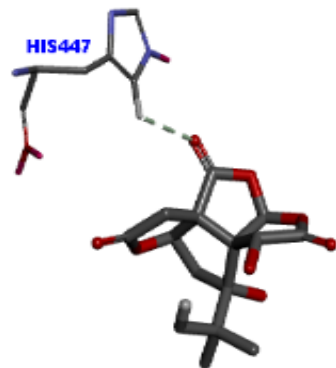
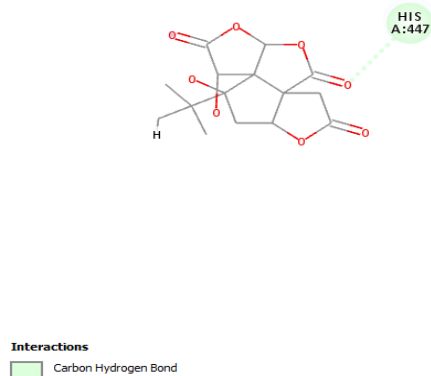
Ginkgolídeo A



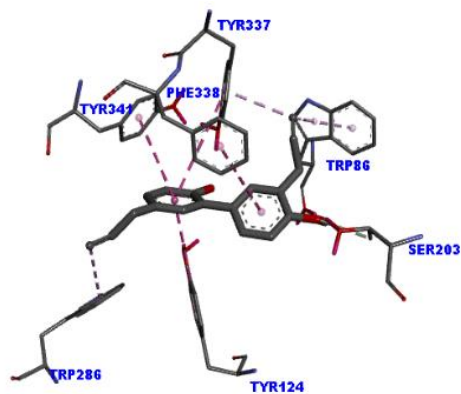
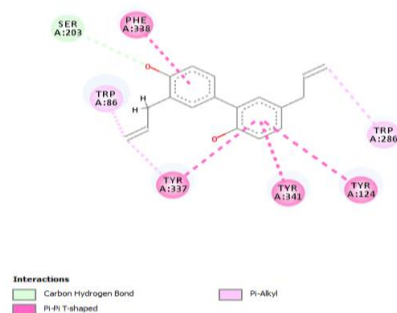
Ginkgolídeo B



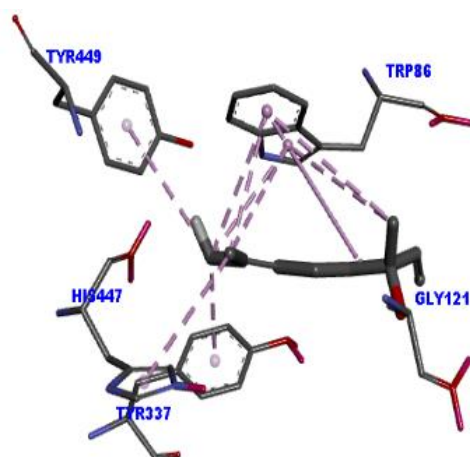
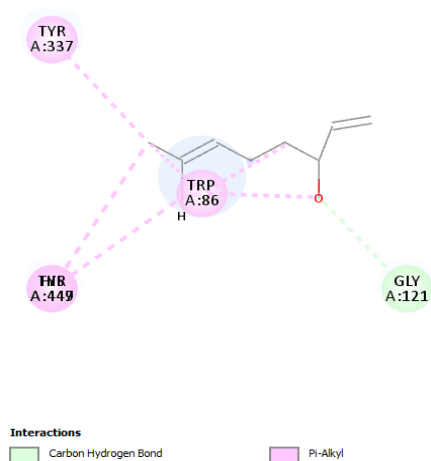
Ginkgolídeo C



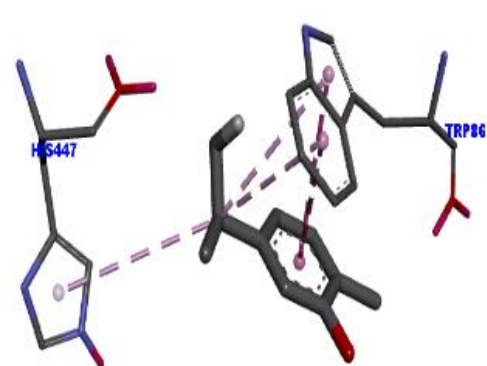
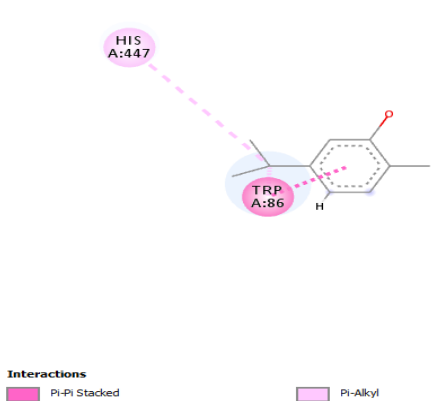
Bilobalide



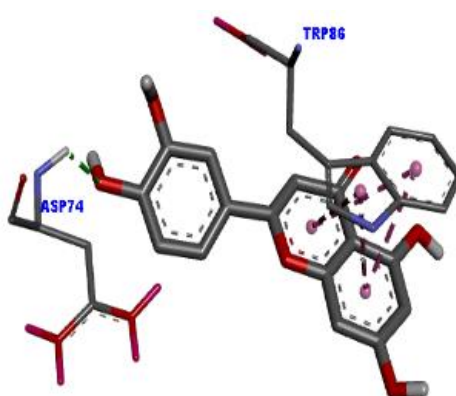
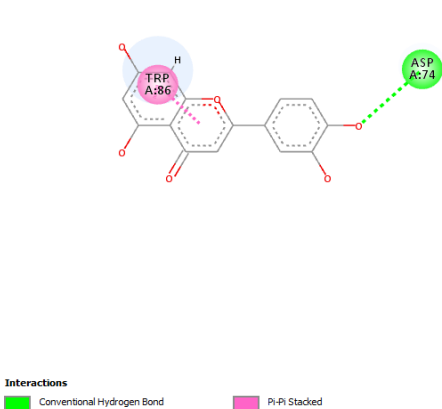
Honokiol



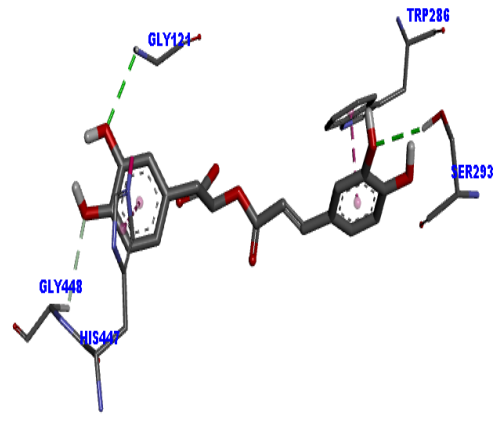
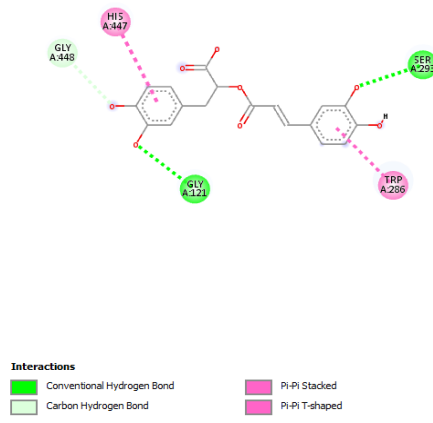
Linalool



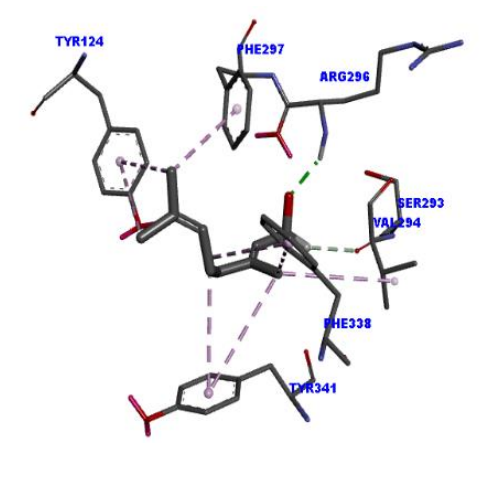
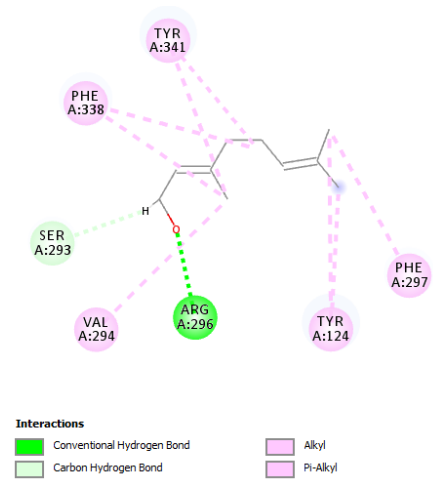
Carvacrol



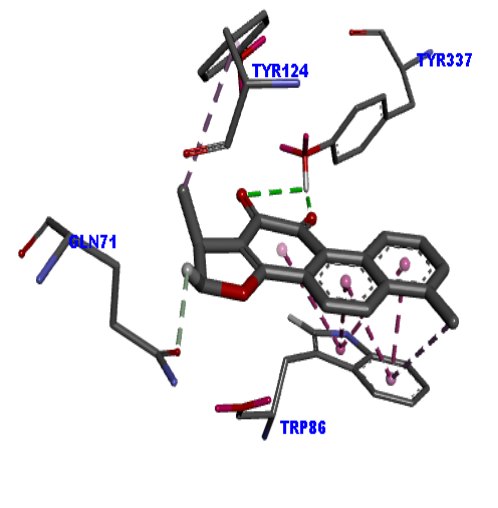
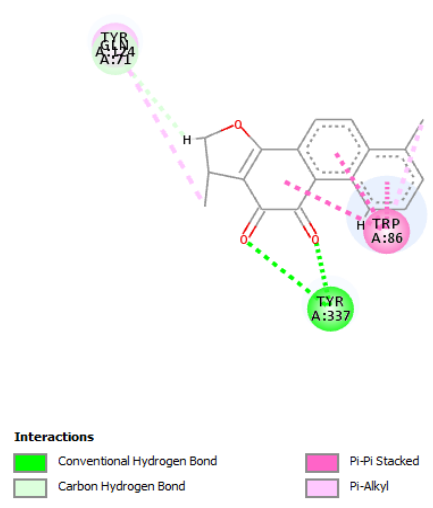
Luteolina



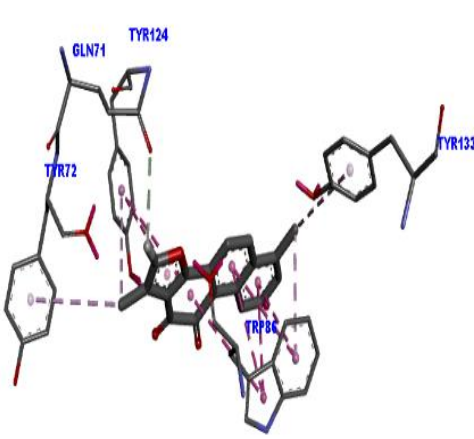
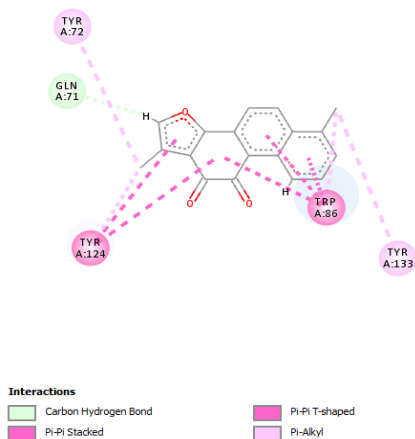
Ácido  
rosmarínico



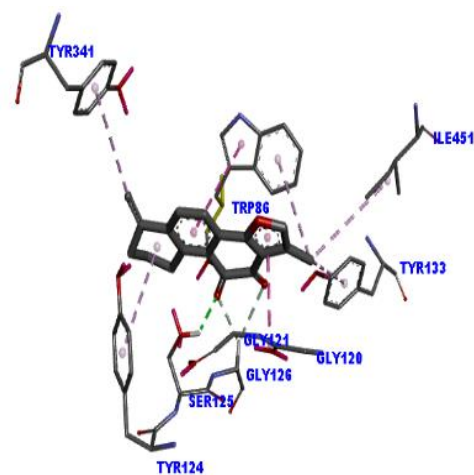
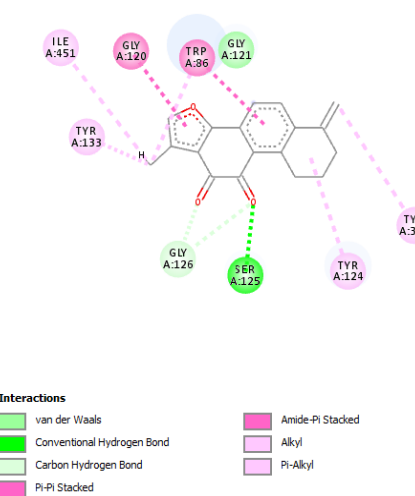
Geraniol



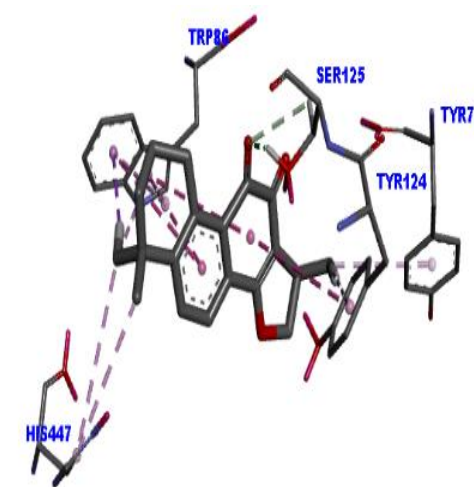
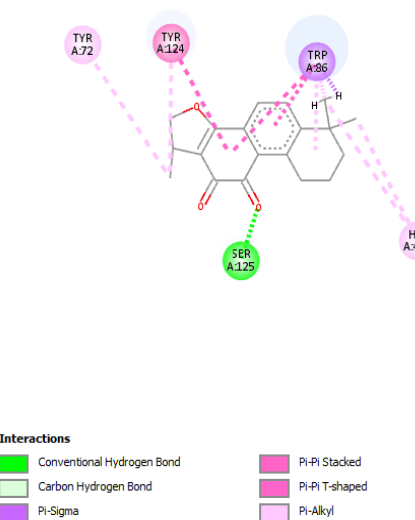
Dihidrotanshinona



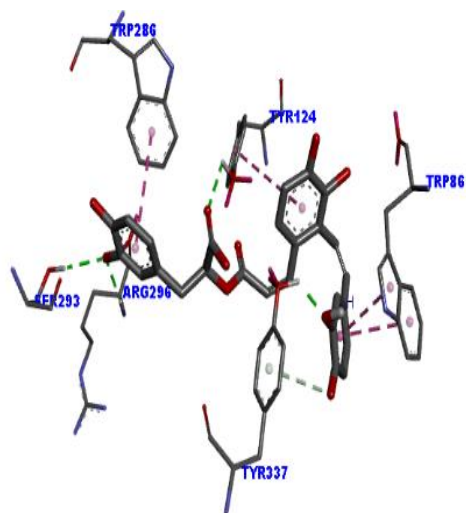
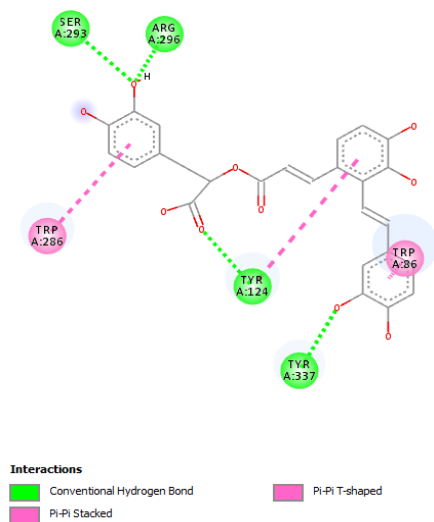
Tanshinona I



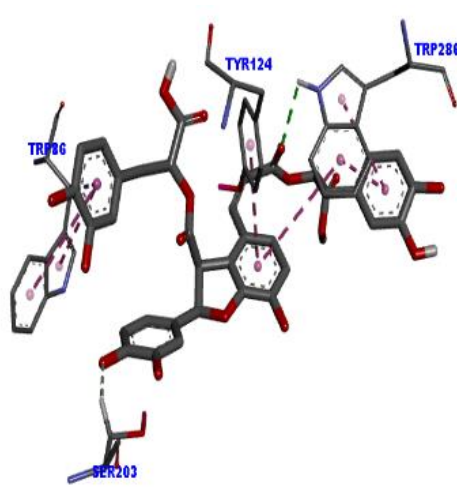
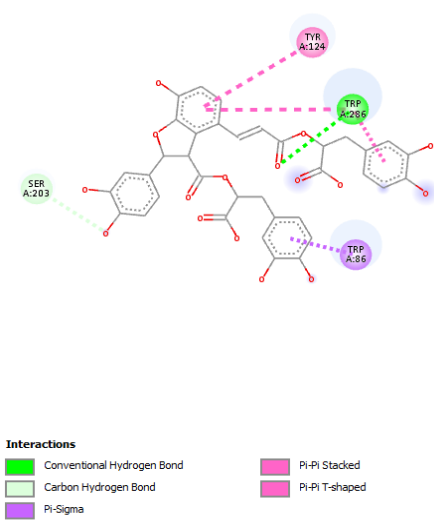
Metilenetanshinona



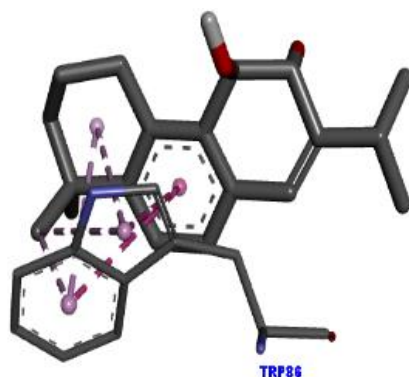
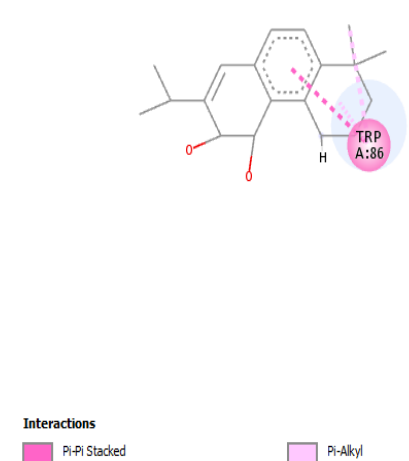
Criptotanshino  
na



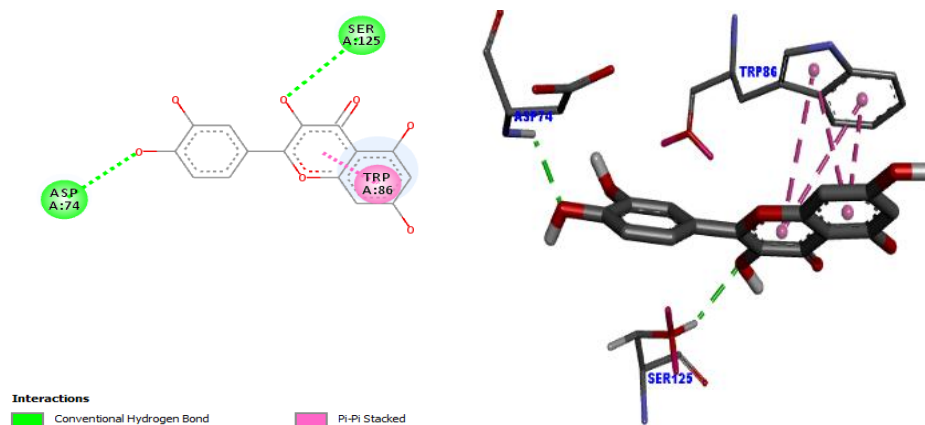
Ácido  
salvianólico A



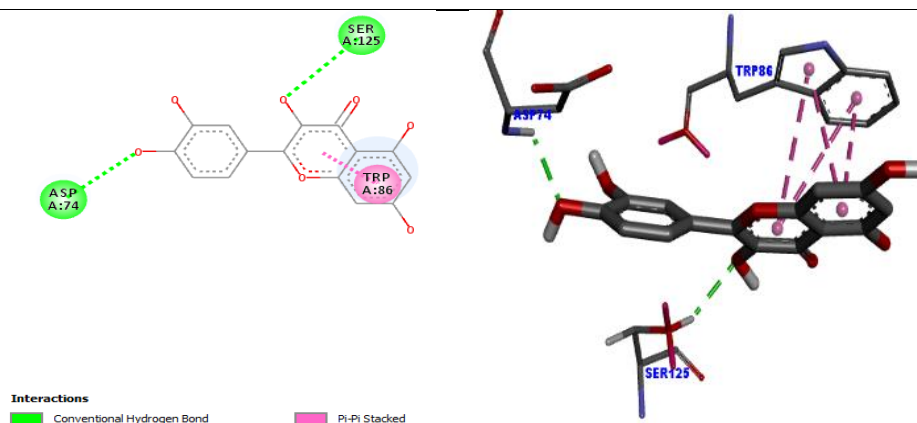
Ácido  
salvianólico B



Rosmariquino  
na



Quercetina

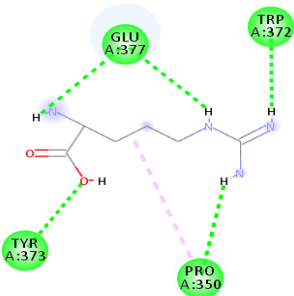
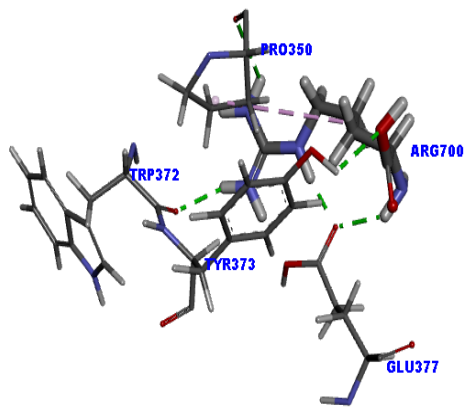
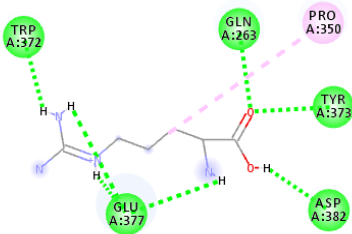
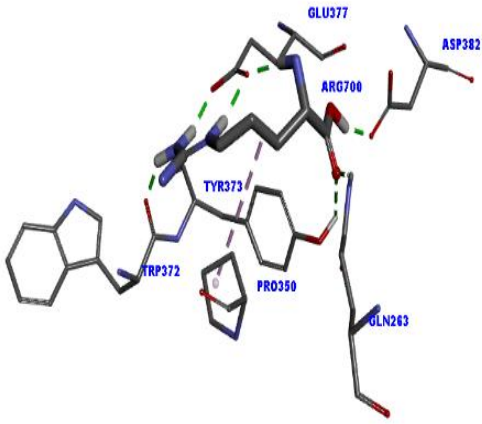
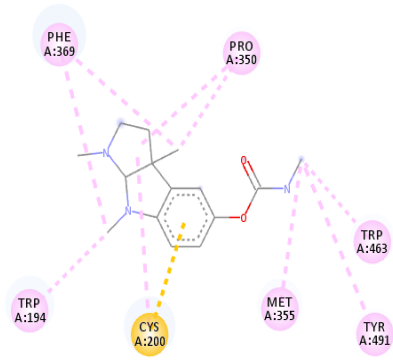
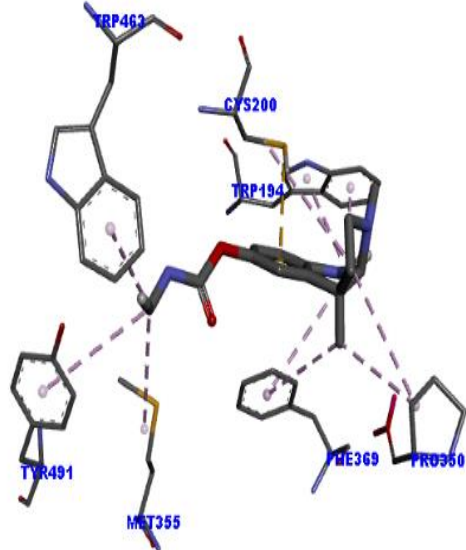


Fonte: Discovery Studio Visualizer 2020

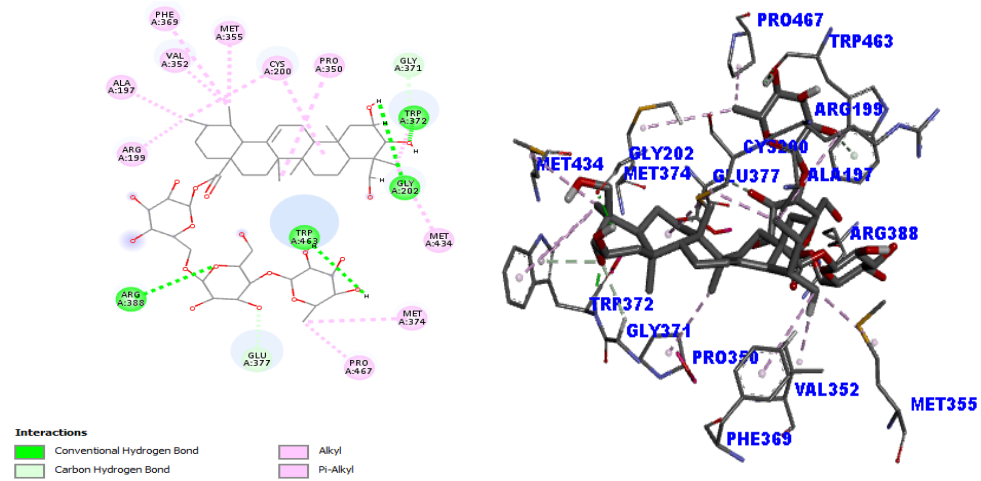
**Tabela 5** – Análise das interações intermoleculares entre a enzima AChE e o ligante cristalográfico e dos resultados de *Docking* Molecular entre a enzima AChE e as 24 moléculas de produtos naturais o ligante do complexo.

| MOLECULAS            | TIPO DE INTERAÇÃO |       |       |       |        |        |        |        |        | Outras informações |       |       |        |        |       |       |        |       |
|----------------------|-------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|
|                      | Hidrofóbica       |       |       |       |        |        |        |        |        | Interação de H     |       |       |        |        | Total | Score | Outros | Geral |
|                      | His447            | Tyr72 | Asp74 | Trp86 | Tyr124 | Trp286 | Tyr341 | Ser203 | His447 | Tyr72              | Asp74 | Trp86 | Tyr124 | Trp286 |       |       |        |       |
| Estrutura complex.   | 1                 | -     | -     | 3     | -      | -      | -      | 2      | 1      | -                  | 1     | -     | 1      | -      | 9     | -     | 22     | 31    |
| Ligante              | 1                 | -     | -     | 3     | -      | -      | -      | -      | 1      | -                  | 1     | -     | 1      | -      | 7     | 71    | 20     | 27    |
| Fisostigmina         | 1                 | -     | -     | 4     | -      | -      | 1      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 6     | 59    | 2      | 8     |
| Asiaticosídeo        | -                 | 3     | -     | -     | -      | 4      | 3      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 10    | 26    | 6      | 16    |
| Curcumina            | -                 | -     | -     | -     | -      | 7      | -      | -      | -      | 1                  | -     | -     | -      | -      | 8     | 91    | 2      | 10    |
| Demetoxicurcumina    | 1                 | -     | -     | 1     | -      | 2      | -      | -      | -      | 1                  | -     | -     | -      | -      | 5     | 87    | 4      | 9     |
| Bisdemetoxicurcumina | -                 | -     | -     | 2     | -      | -      | 1      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 3     | 81    | 3      | 6     |
| Calebina-A           | -                 | -     | -     | 4     | -      | 3      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 7     | 91    | 4      | 11    |
| Ginkgolídeo A        | 1                 | 1     | -     | 2     | 1      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | 1     | -      | -      | 6     | 53    | 4      | 10    |
| Ginkgolídeo B        | 1                 | 1     | -     | 2     | 1      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | 1     | -      | -      | 6     | 49    | 4      | 10    |
| Ginkgolídeo C        | 1                 | -     | -     | 1     | -      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 2     | 34    | 2      | 4     |
| Bilobalide           | -                 | -     | -     | -     | -      | -      | -      | -      | 1      | -                  | -     | -     | -      | -      | 1     | 48    |        | 1     |
| Honokiol             | -                 | -     | -     | -     | 1      | -      | 5      | 1      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 7     | 75    | 2      | 9     |
| Linalool             | -                 | -     | -     | 11    | -      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 11    | 47    | 1      | 12    |
| Carvacrol            | -                 | -     | -     | 5     | -      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 5     | 52    |        | 5     |
| Luteolina            | -                 | -     | -     | 4     | -      | -      | -      | -      | -      | -                  | 1     | -     | -      | -      | 5     | 80    |        | 5     |
| Ácido rosmarínico    | 1                 | -     | -     | -     | -      | 1      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 2     | 92    | 3      | 5     |
| Geraniol             | -                 | -     | -     | -     | 2      | -      | 2      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 4     | 50.00 | 6      | 10    |
| Dihidrotanshinona    | -                 | -     | -     | 6     | 1      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 7     | 67    | 3      | 10    |
| Tanshinona I         | -                 | -     | 1     | 6     | 3      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 10    | 61    | 2      | 12    |
| Metilenetanshinona   | -                 | -     | -     | 2     | 1      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 3     | 61    | 6      | 9     |
| Criptotanshinona     | 2                 | 1     | -     | 7     | 2      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 12    | 55    | 2      | 14    |
| Ácido salvianólico A | -                 | -     | -     | 2     | 1      | 1      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | 1      | -      | 5     | 102   | 3      | 8     |
| Ácido salvianólico B | -                 | -     | -     | 3     | 1      | 3      | -      | 1      | -      | -                  | -     | -     | -      | 1      | 9     | 87    |        | 9     |
| Rosmariquinona       | -                 | -     | -     | 6     | -      | -      | -      | -      | -      | -                  | -     | -     | -      | -      | 6     | 66    |        | 6     |
| Quercetina           | -                 | -     | -     | 4     | -      | -      | -      | -      | -      | -                  | 1     | -     | -      | -      | 5     | 82    | 1      | 6     |

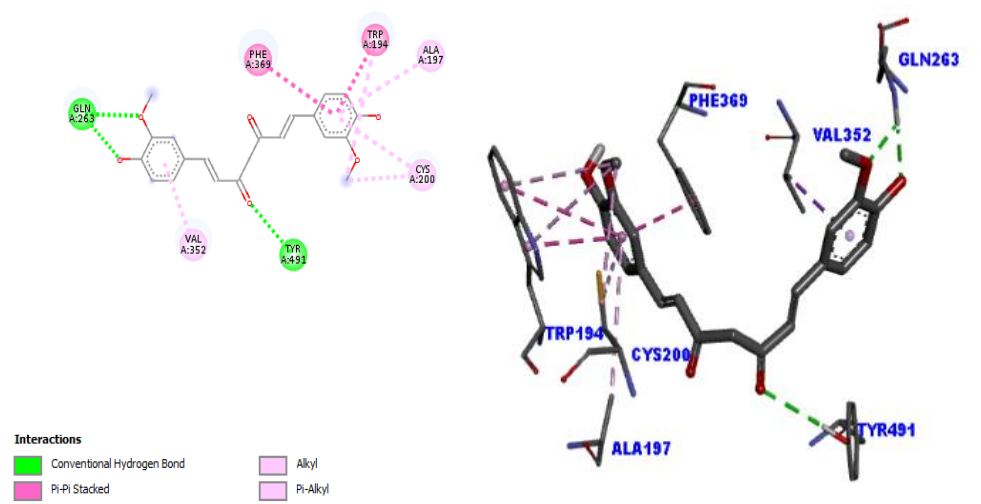
**Tabela 6** – Apresentação das moléculas selecionadas para o estudo de *docking* molecular entre NOS e as moléculas de produtos naturais.

| MOLÉCULAS    | 2D                                                                                                                                                                                                   | 3D                                                                                   |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| NOS complex  |  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Conventional Hydrogen Bond</li> <li>Alkyl</li> </ul>    |    |
| Ligante      |  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Conventional Hydrogen Bond</li> <li>Alkyl</li> </ul>   |   |
| Fisostigmina |  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Pi-Sulfur</li> <li>Alkyl</li> <li>Pi-Alkyl</li> </ul> |  |

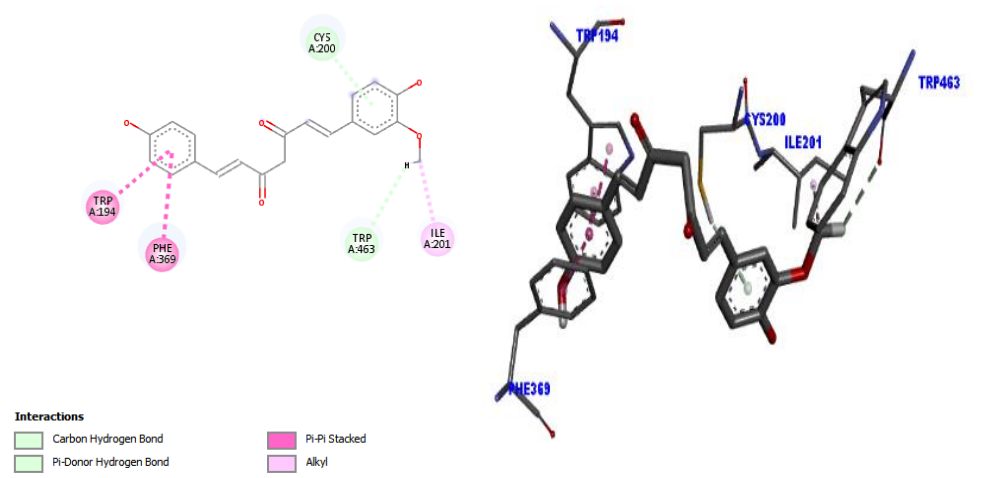
Asiaticosídeo



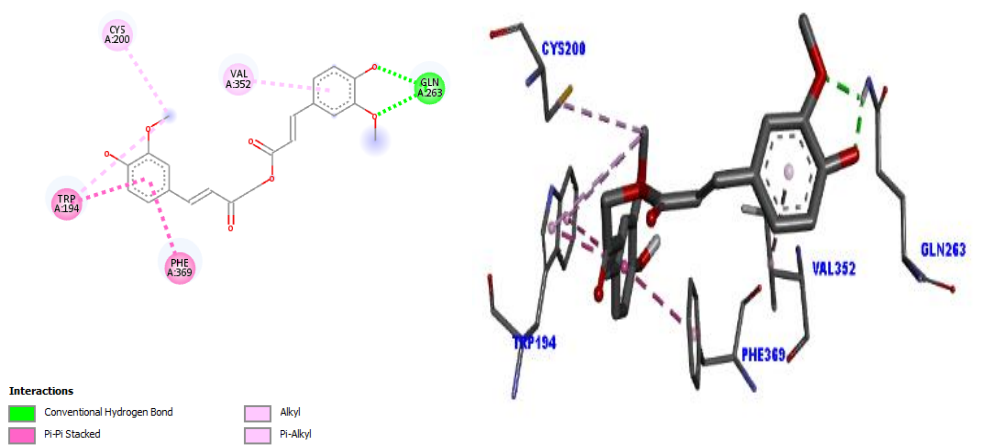
Curcumina



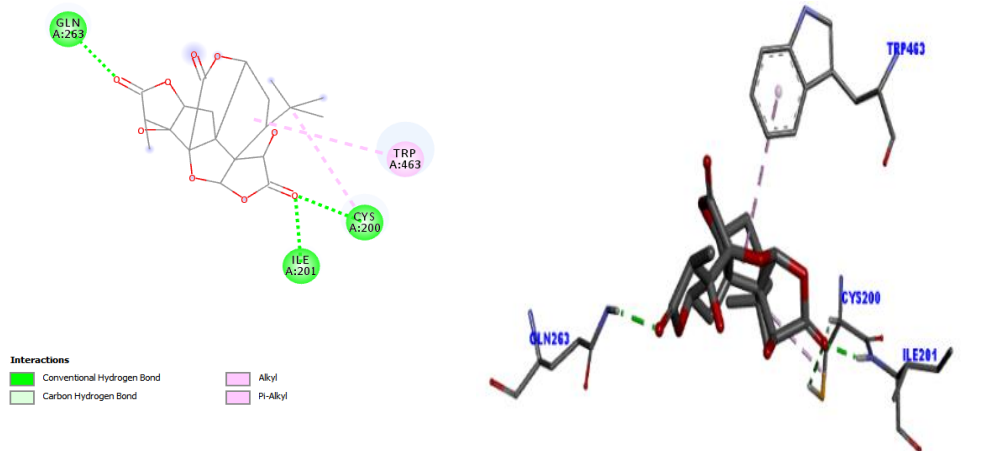
Demetoxicurcuma



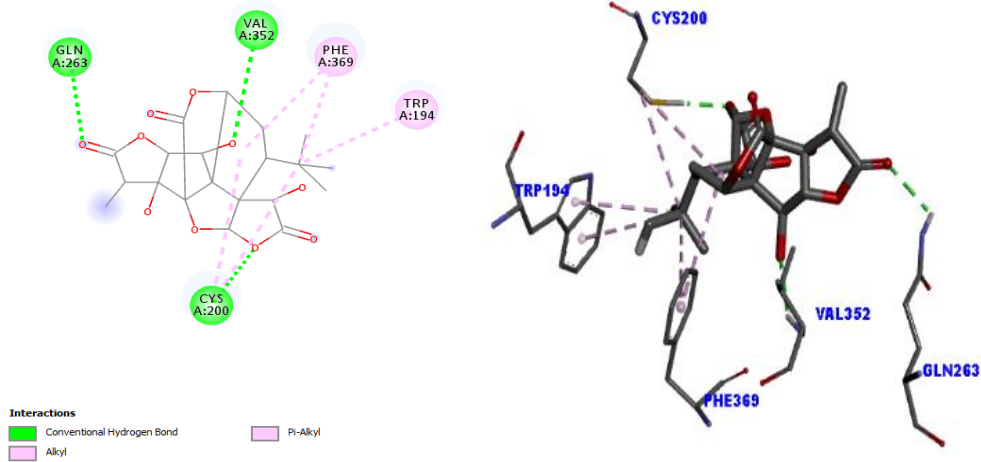
Bisdemetoxicu  
rcumina



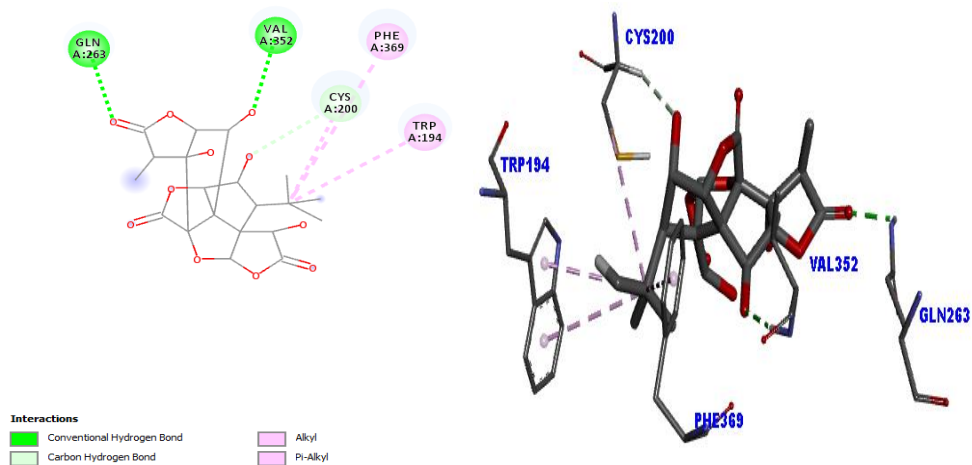
Calebina-A



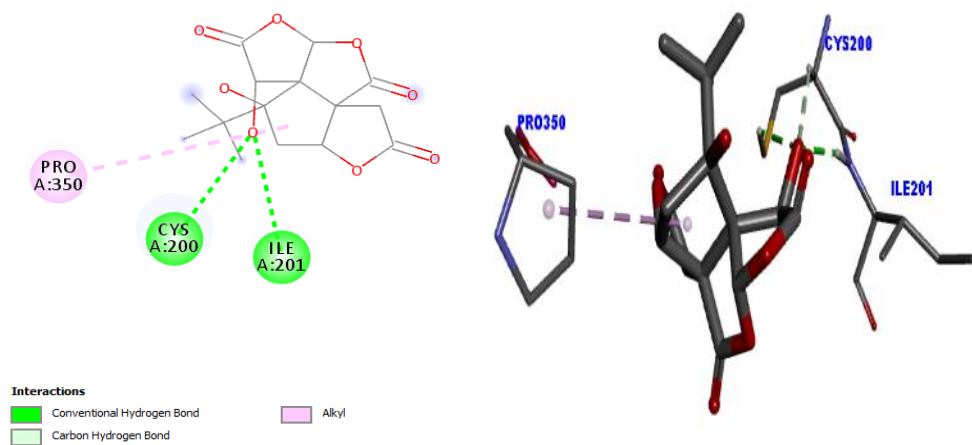
Ginkgolídeo A



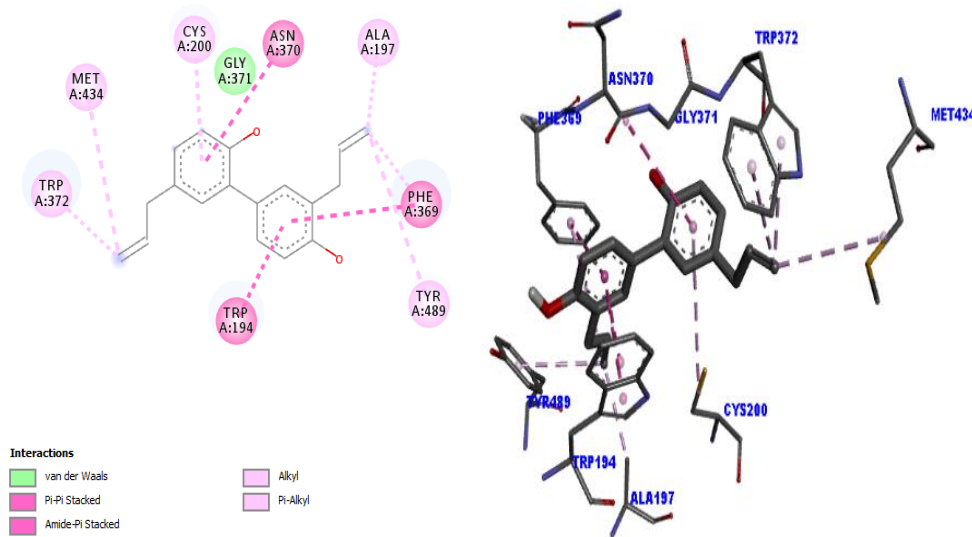
Ginkgolídeo B



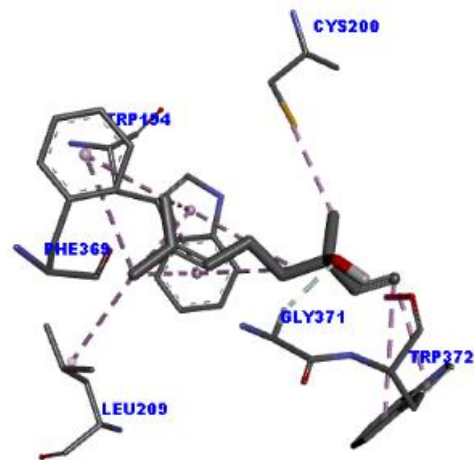
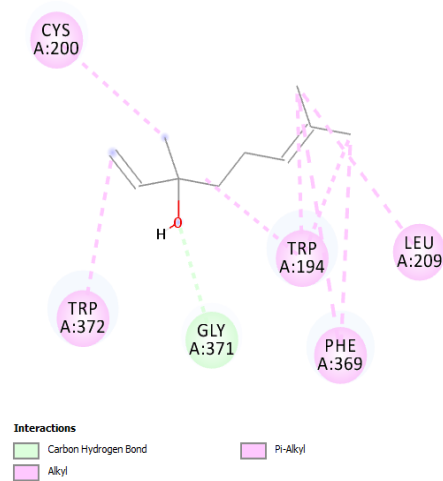
Ginkgolídeo C



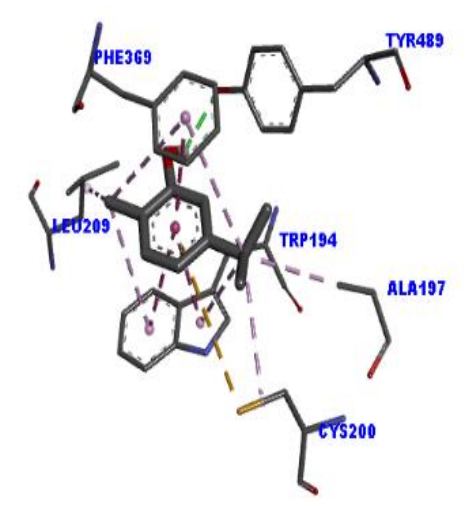
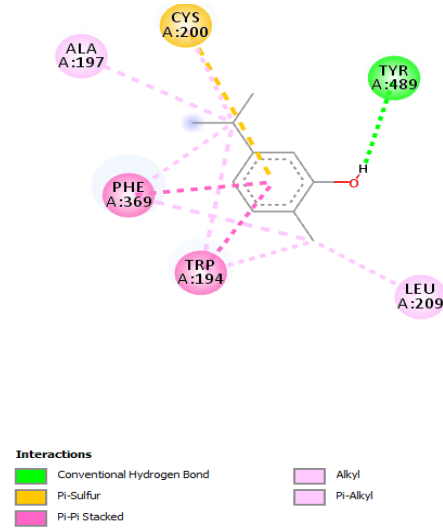
Bilobalide



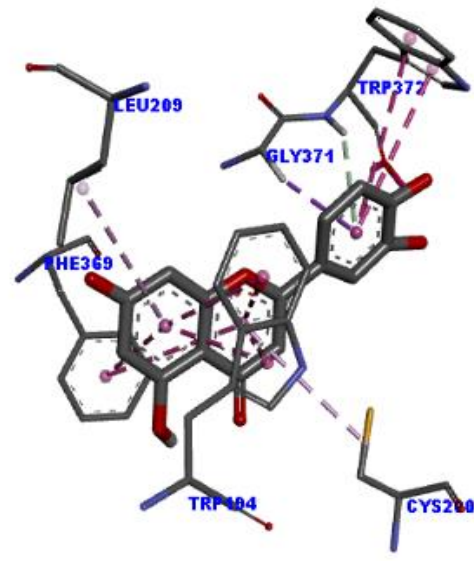
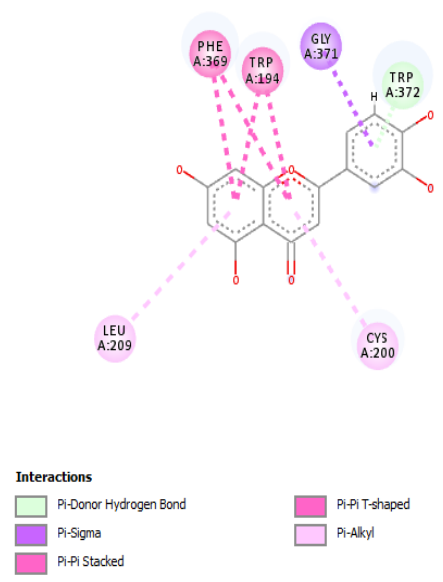
Honokiol



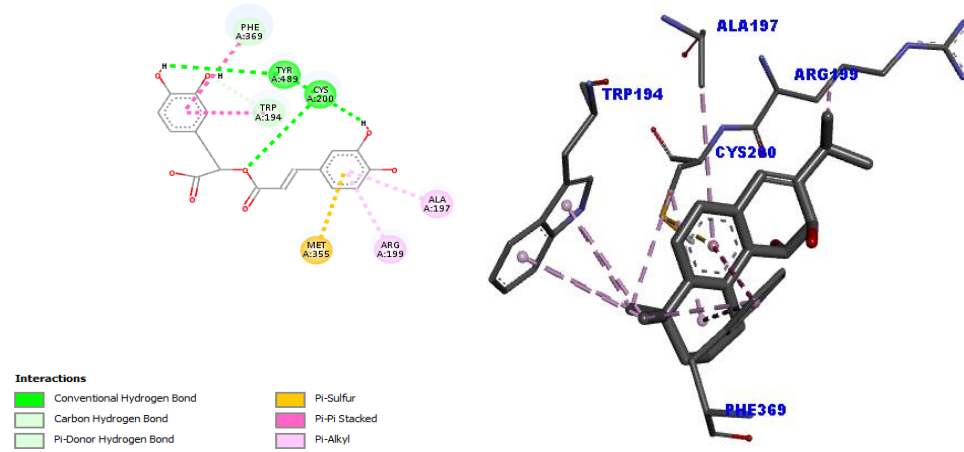
Linalool



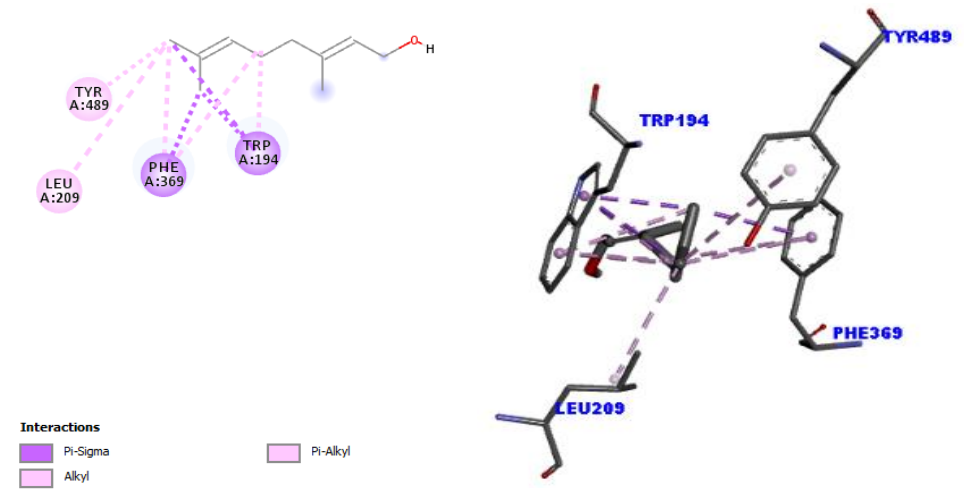
Carvacrol



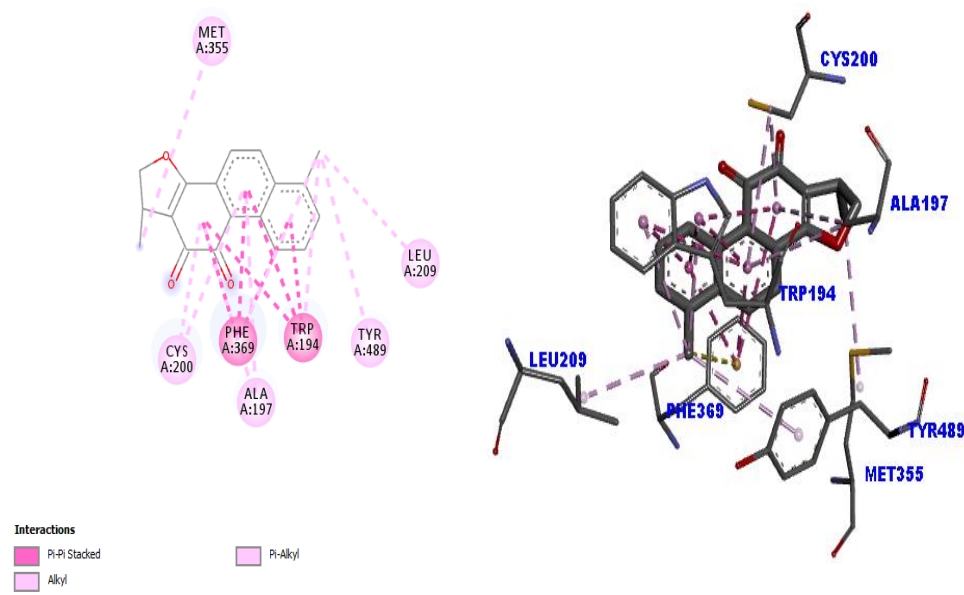
Luteolina



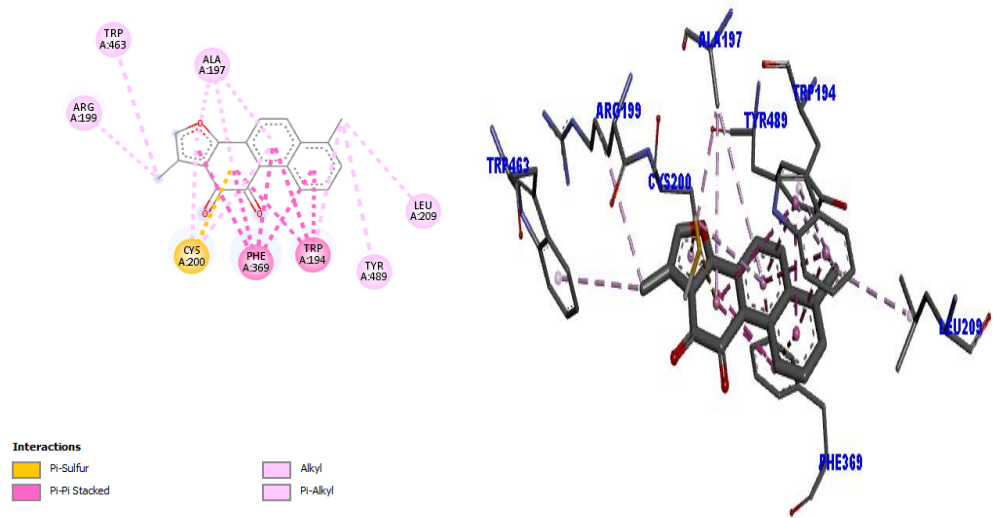
Ácido  
rosmarínico



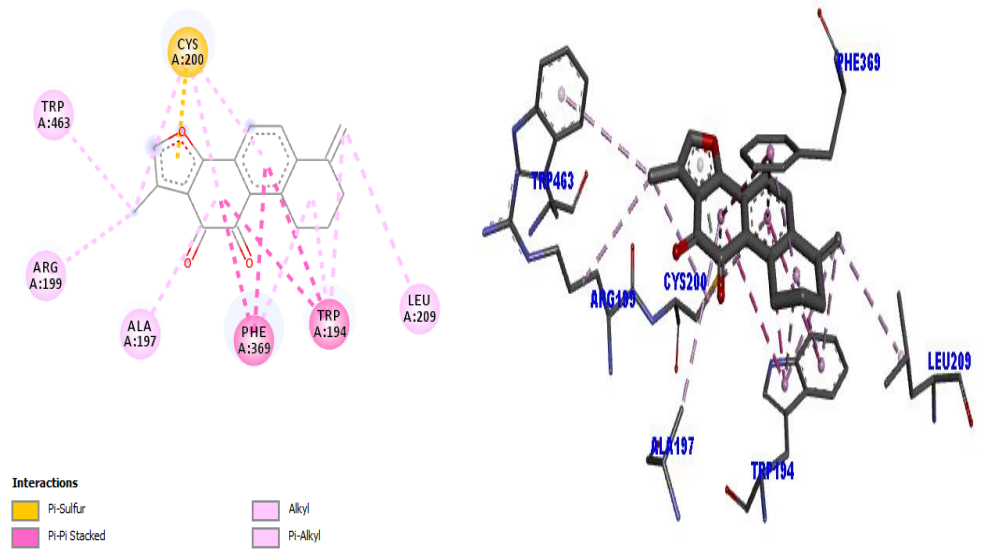
Geraniol



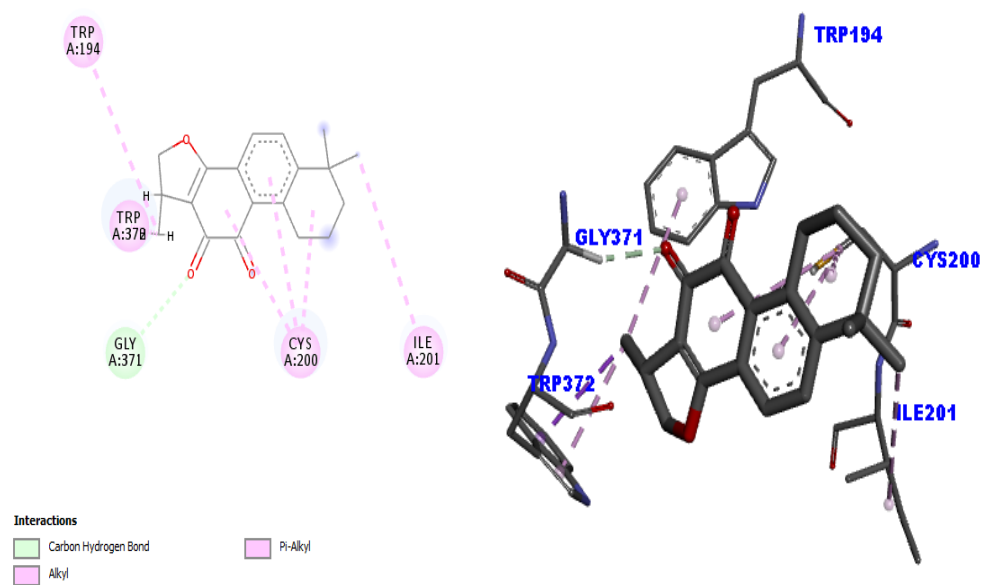
Dihidrotanshinona



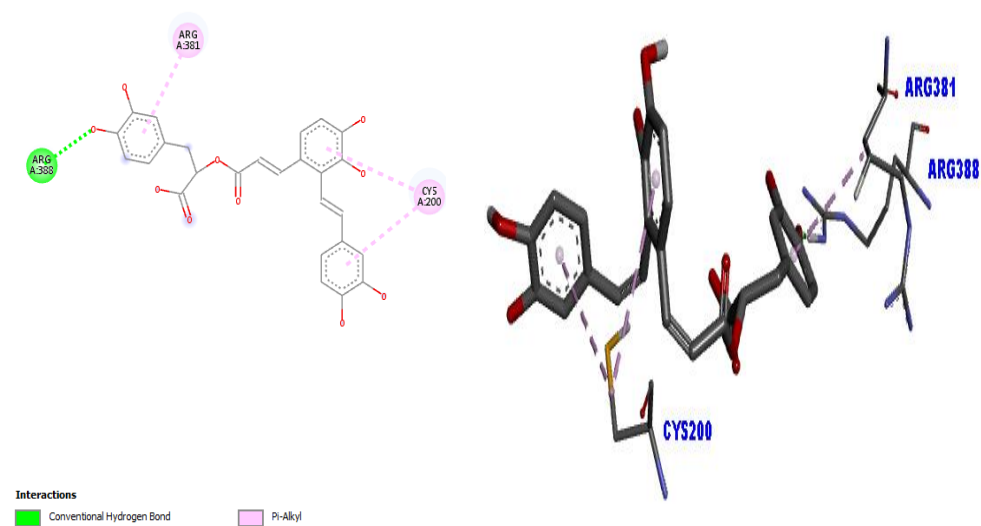
Tanshinona I



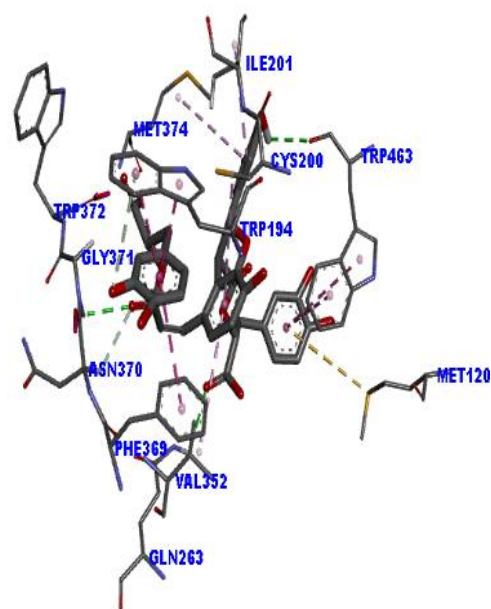
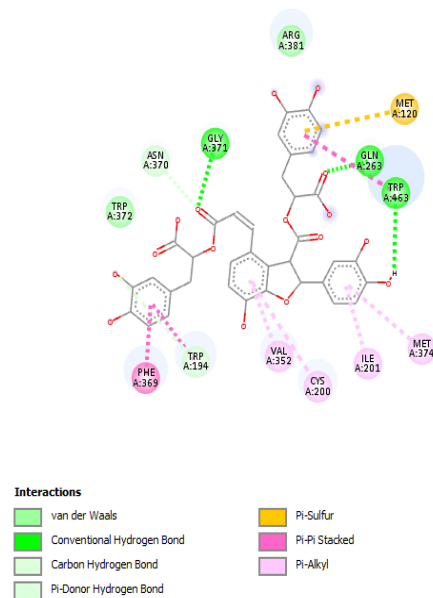
Metilenetanshinona



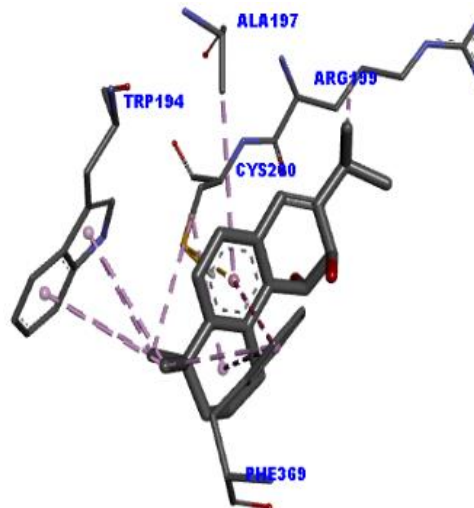
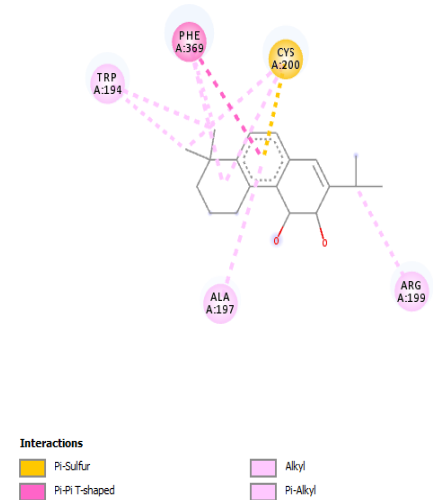
Criptotanshinona



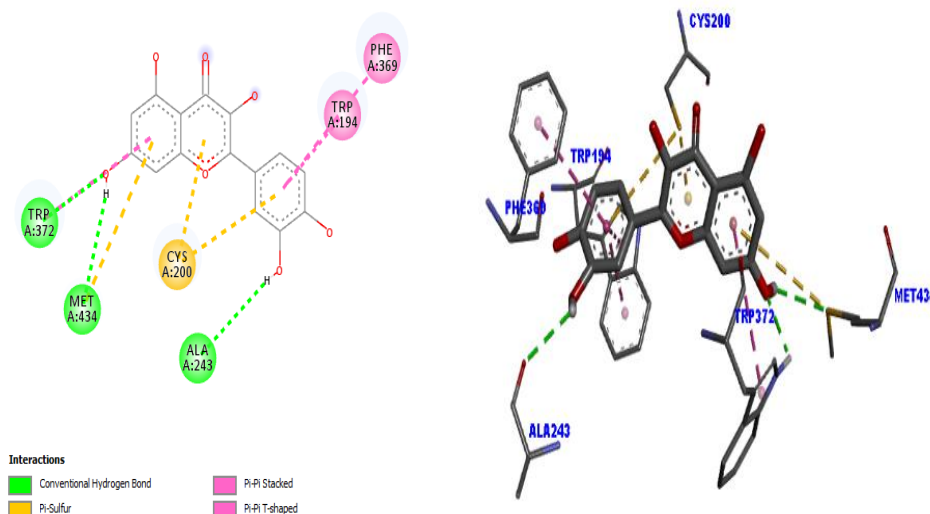
Ácido  
salvianólico A



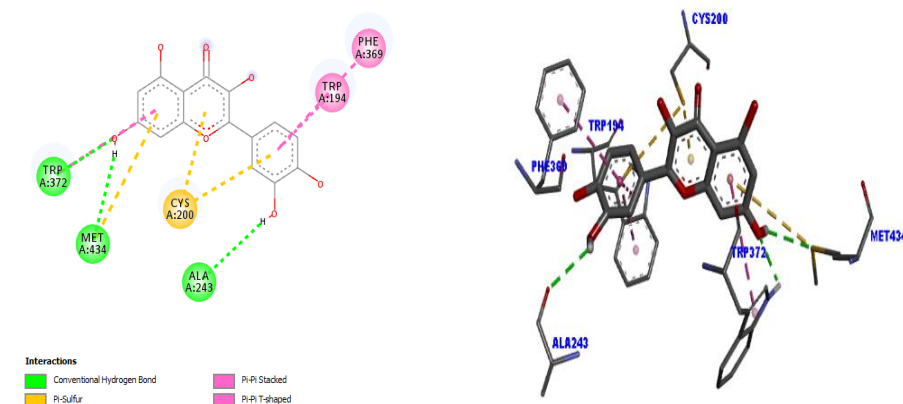
Ácido  
salvianólico B



Rosmariquino  
na



Quercetina



**Fonte:** Discovery Studio Visualizer 2020.

Com relação as interações de hidrogênio obtidas por meio da simulação de *docking* com a AChE, observou-se que honokiol e ácido salvianólico B interagiram com o aminoácido Ser203, o bilobalide fez interação com o resíduo His447, a curcumina e demetoxicurcumina com o aminoácido Tyr72, a luteolina e quercetina com o resíduo Asp74, o ginkgolídeo A e ginkgolídeo B com o aminoácido Trp86, o ácido salvianólico A com o aminoácido Tyr124 e o ácido salvianólico B com Trp286.

Na análise da simulação de *docking* entre as moléculas selecionadas e a enzima NOS, verificou-se que não houve interação do tipo hidrofóbica entre as moléculas estudadas e os aminoácidos do sítio ativo. Em relação às interações de hidrogênio, observou-se que curcumina, calebina-A, ginkgolídeo A, ginkgolídeo B, ginkgolídeo C, ácido salvianólico A e ácido salvianólico B interagiram com o aminoácido Gln263. Já

asiaticosideo interagiu com os aminoácidos Glu377 e Arg388 e ácido salvianólico A com o aminoácido Arg388.

Neste estudo, as moléculas que apresentaram os resultados mais significativos no estudo de *docking* molecular foram: calebina A, quercetina e luteolina.

Calebina - A se destacou entre as melhores poses de *docking*, tanto para AChE como para a enzima NOS e também apresentou interações do tipo hidrofóbica com a enzima AChE e de hidrogênio no *docking* com a NOS. Quercetina também apresentou uma das melhores poses de *docking* para a enzima AChE e interações do tipo hidrofóbica e de hidrogênio com a enzima AChE. E luteolina que apresentou interações do tipo hidrofóbica e de hidrogênio com a enzima AChE.

Em um estudo utilizando extrato padronizado de folhas de *Ginkgo biloba*, identificaram-se inibidores naturais da AChE, os resultados demonstraram que esses compostos podem se ligar ao sítio ativo da AChE humana em torno de vários resíduos como: Asp74, Trp286 e Tyr341 (ZHANG et al., 2018), reforçando o que foi encontrado neste estudo.

Para a curcumina, foram observadas 7 interações do tipo hidrofóbica com o aminoácido Trp286. Este resultado se assemelha com o encontrado por Abdul Manap et al. (2019), onde foi avaliado os efeitos sinérgicos da curcumina e da piperina como inibidores da acetilcolina, observou-se que a curcumina também foi capaz de se ligar ao aminoácido Trp286.

Tang et al. (2019) realizaram um método integrado, incluindo *docking* molecular e estudos experimentais, para verificar a interação entre inibidores presentes na *Salvia miltiorrhiza* e AChE, alguns compostos foram identificados como potentes inibidores da AChE, como no caso do Ácido Salvianólico A, Ácido Salvianólico B e Ácido Rosmarínico.

Estudo de Wong et al. (2010) realizou *docking* molecular utilizando a dihidrotanshinona e criptotanshinona, extraídas da *Salvia miltiorrhiza* Bge. (Danhen), para inibir a enzima AChE, ambos os compostos interagiram favoravelmente principalmente por meio de interações hidrofóbicas, houve interação com os aminoácidos Trp86, Tyr124, Tyr337, Ser203 e His447. Os resultados descritos no estudo de Wong et al. se assemelham com o que foi encontrado nesta pesquisa, onde também houve interação do tipo hidrofóbica com os aminoácidos His447, Trp86 e Tyr124.

O estudo de Khan et al. (2009) examinou as atividades inibitórias da AChE e butirilcolinesterase (BChE) de quatro derivados de flavonoides, o flavonoide quercetina realizou interações de hidrogênio e hidrofóbicas com vários aminoácidos, onde a mesma fez interação de hidrogênio com o aminoácido Asp74. Neste estudo, através das análises de *docking*, foi encontrado resultado semelhante com o estudo de Khan, onde também houve interação de hidrogênio entre quercetina e o aminoácido Asp74.

Já no estudo de Singh e Konwar (2013), analisaram *docking* molecular da quercetina e seus análogos contra a enzima iNOS, houve interação com os resíduos Gln263, Pro350, Gly371, Asp382 e Arg388, o que demonstra um resultado diferente do que foi encontrado neste estudo, pois após realizar a análise de *docking* não foi encontrada nenhuma interação entre quercetina e o sítio catalítico da NOS.

## 5.5 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS

As propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos compostos são uma das principais razões para que se encerre o desenvolvimento de candidatos a fármacos (GUPTA; MOHAN, 2014).

Aproximadamente 40% dos candidatos a fármacos falham nos ensaios clínicos devido às propriedades deficientes do ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Essas falhas no estágio final contribuem significativamente para o custo crescente do desenvolvimento de novos medicamentos (SCHRÖDINGER, 2020).

Neste estudo, as propriedades farmacocinéticas (ADME) foram previstas usando o módulo QikProp do software Schrödinger. O QikProp prevê a maior variedade de propriedades farmacocinéticas relevantes - octanol / água e água / gás log Ps, log S, log BB, atividade geral do SNC, permeabilidades celulares Caco-2 e MDCK, log Khsa para previsão de ligação à albumina sérica humana de modo que as decisões sobre a adequação de uma molécula podem ser feitas com base em uma análise completa, ele baseia suas previsões na estrutura molecular 3D completa e identifica moléculas com propriedades calculadas que estão fora da faixa normal de medicamentos conhecidos (SCHRÖDINGER, 2020). Este software gera o descritor determinado de star, indicativo de que as moléculas submetidas possuem semelhanças estruturas fortes com o seu

banco de dados quanto mais próximo de 0 o valor resultante for, assim transmite uma idéia de que os demais descritores são confiáveis dentro das comparações realizadas pelo QikProp. Logo todas as moléculas obtiveram valor de stars igual a 0.

Assim, foram analisados alguns parâmetros relacionados às propriedades farmacocinéticas dos produtos naturais que incluíram porcentagem de absorção oral humana, permeabilidade aparente em células Caco-2 e MDCK, coeficiente de partição cérebro/sangue (logBB), atividade predita no sistema nervoso central e previsão de ligação à albumina sérica humana (plogKhsa). As propriedades farmacocinéticas descritas na **Tabela 8** foram analisadas com base nos valores de referência do software QikProp.

**Tabela 7** – Predição de propriedades farmacocinéticas dos produtos naturais estudados calculadas usando o software QikProp

| MOLÉCULAS            | STAR | %HOA <sup>(a)</sup> | PCACO-2 <sup>(b)</sup> | PMDCK <sup>(c)</sup> | HOA <sup>(d)</sup> | LogBB <sup>(e)</sup> | SNC | LogKhsa |
|----------------------|------|---------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|-----|---------|
| Fisostigmina         | 0    | 73.045              | 150.21                 | 77.916               | 2                  | 0.733                | 2   | -0.03   |
| Asiaticosídeo        | 0    | 0                   | 1.35                   | 0.39                 | 1                  | -5.063               | -2  | -1.46   |
| Curcumina            | 0    | 84.2                | 187.9                  | 81.2                 | 2                  | -2.129               | -2  | -0.02   |
| Demetoxicurcumina    | 0    | 82.47               | 171.91                 | 73.76                | 3                  | -2.074               | -2  | -0.05   |
| Bisdemetoxicurcumina | 0    | 81.06               | 160.25                 | 68.36                | 3                  | -1.996               | -2  | -0.07   |
| Calebina-A           | 0    | 100                 | 3814.53                | 2102.9               | 3                  | 0.086                | 1   | 0.04    |
| Ginkgolídeo A        | 0    | 65.3                | 165.47                 | 70.77                | 2                  | -1.015               | -2  | -0.83   |
| Ginkgolídeo B        | 0    | 57.32               | 93.6                   | 38.23                | 2                  | -1.239               | -2  | -0.87   |
| Ginkgolídeo C        | 0    | 36.46               | 55.09                  | 21.56                | 2                  | -1.398               | -2  | -0.91   |
| Bilobalide           | 0    | 57.09               | 126.86                 | 53.11                | 2                  | -0.885               | -1  | -0.89   |
| Honokiol             | 0    | 100                 | 1910.25                | 995.81               | 3                  | -0.587               | 0   | 0.52    |
| Linalool             | 0    | 100                 | 5275.02                | 2985.31              | 3                  | 0.015                | 1   | 0.13    |
| Carvacrol            | 0    | 100                 | 3814.53                | 2102.9               | 3                  | 0.086                | 1   | 0.04    |
| Luteolina            | 0    | 61.87               | 45.24                  | 17.42                | 3                  | -1.895               | -2  | -0.22   |
| Ácido rosmarínico    | 0    | 41.15               | 2.7                    | 1.05                 | 1                  | -3.16                | -2  | -0.60   |
| Geraniol             | 0    | 100                 | 2852.67                | 1536.11              | 3                  | -0.236               | 0   | -0.02   |
| Dihidrotanshinona    | 0    | 100                 | 1612.02                | 828.88               | 3                  | -0.15                | 0   | -0.14   |
| Tanshinona I         | 0    | 100                 | 1593.34                | 818.5                | 3                  | -0.152               | 0   | -0.12   |
| Metilenetanshinona   | 0    | 100                 | 1741.28                | 900.95               | 3                  | -0.189               | 0   | -0.09   |
| Criptotanshinona     | 0    | 100                 | 1757.35                | 909.94               | 3                  | -0.12                | 0   | 0.11    |
| Ácido salvianólico A | 0    | 32.04               | 3.07                   | 1.21                 | 1                  | -2.956               | -2  | -0.56   |
| Ácido salvianólico B | 0    | 0                   | 0.01                   | 0                    | 1                  | -5.849               | -2  | -0.51   |
| Rosmariquinona       | 0    | 100                 | 1921.68                | 1002.25              | 3                  | -0.283               | 0   | 0.46    |
| Quercetina           | 0    | 53.42               | 23.51                  | 8.59                 | 2                  | -2.215               | -2  | -0.38   |

A via oral continua sendo a via mais popular de administração de medicamentos em todo o mundo, a previsão do desempenho *in vivo* de um medicamento candidato após a administração oral em humanos é um dos principais objetivos e desafios na descoberta de medicamentos nas indústrias hoje. Um processo essencial que conduz o

desempenho *in vivo* é a absorção oral de um composto do trato gastrointestinal (GIT) para a circulação sanguínea (KELDENICH, 2009). Ao analisar a porcentagem de absorção oral humana, onde um valor >80% é considerado alta absorção e menor que <25% é baixa absorção, as moléculas que demonstraram possuir boa absorção por via oral foram: curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, calebina-A, honokiol, linalool, carvacrol, geraniol, dihidrotanshinona, tanshinone, metilenetanshinona, criptotanshinona e rosmariquinona. Já as que apresentaram média absorção foram: ácido salvianólico A, ácido rosmariníco, luteolina, bilobalide, ginkgolídeo A, , ginkgolídeo B e ginkgolídeo C, apenas as moléculas asiaticosídeo e ácido salvianólico B apresentaram baixa absorção. Fazendo uma comparação entre os valores das moléculas selecionadas para este estudo e a molécula de referência fisostigmina, foi possível observar que a maioria delas apresentaram um resultado próximo da molécula de referência.

Com relação à predição de HOA, as moléculas que apresentaram baixa absorção oral humana foram asiaticosídeo, ácido rosmariníco, ácido salvianólico A e ácido salvianólico B, as moléculas que apresentaram média absorção foram curcumina, ginkgolídeo A, B e C, bilobalide e quercetina, as que apresentaram alta absorção foram demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, calebina-A, honokiol, linalool, luteolina, Geraniol, dihidrotanshinona, tanshinona I, metilenetanshinona, criptotanshinona e rosmariquinona. Todas as moléculas ficaram com valores próximos da molécula utilizada como referência (fisostigmina 2).

Os modelos de células Caco-2 e MDCK são correlativos à absorção intestinal humana e permitem a avaliação mecanística de permeabilidade de drogas, como difusão passiva (paracelular, transcelular), captação mediada por portador, e efluxo mediado por portadores. Assim, eles servem como ferramentas de triagem rápida para permeabilidade de drogas e transporte fornecendo informações no nível celular (VOLP, 2011).

As células Caco-2 são uma linhagem de carcinoma de cólon humano considerada atualmente o padrão ouro para avaliação da absorção de fármacos por via oral. Células Caco-2 diferenciadas se assemelham ao epitélio do intestino humano e permitem a

predição do transporte de drogas mediado por diferentes vias, por exemplo, transporte passivo e ativo pelas vias para e transcelular (EEMINK; BERGSTRÖM, 2018).

Segundo o QikProp, compostos que apresentem valores em células MDCK e células Caco-2 menores que <25 possuem permeabilidade baixa, enquanto que moléculas com valores maiores que >500 possuem permeabilidade alta. Dessa forma, as moléculas que apresentaram boa permeabilidade para ambas as células foram calebina-A, dihidrotanshinona, tanshinona I, metilenetanshinona, criptotanshinona e rosmariquinona. Para MDCK as moléculas com valores mais aproximados da molécula de referência fisostigmina (77.916) foram: demetoxicurcumina (73.76) ginkgolídeo A (70.77), bisdemetoxicurcumina (68.36), curcumina (81.2 ). Já para células Caco-2 os valores mais aproximados da molécula de de referência fisostigmina (150.21) foram: bisdemetoxicurcumina (160.25), demetoxicurcumina (171.90), curcumina (187.9), bilobalide (126.86).

Um bom exemplo que mostra a grande utilidade de um modelo computacional preditivo na descoberta de drogas é um modelo para prever a penetração da barreira hematoencefálica (BBB). No caso de drogas eficazes atuando no sistema nervoso central (SNC), o conhecimento da penetração de drogas pelo BBB é crítico para rastrear potenciais agentes terapêuticos e para melhorar o perfil de efeitos colaterais de drogas com atividade periférica (HOU, 2003). A permeação da barreira hematoencefálica foi analisada por logBB, onde valores entre - 3.0 e 1.2 possuem boa permeabilidade no SNC, conforme parâmetros do QikProp. Nesse contexto, a maioria das moléculas apresentaram boa permeabilidade na barreira hematoencefálica. Quanto mais positivo for o valor, maior será a capacidade do composto de cruzar a barreira hematoencefálica. Ao contrário, compostos que apresentam valores negativos teoricamente não conseguirão cruzá-lo de forma satisfatória (PONZONI,IGNACIO et al., 2019). Observa-se que as moléculas ácido salvianólico B, asiaticosideo e ácido rosmariníco apresentaram valores negativos fora da faixa de referência do QikProp. As moléculas com valores mais aproximados da molécula de referência fisostigmina (0.733) foram: calebina-A (0.086), linalool (0.015) e carvacrol (0.086).

Já a atividade predita no sistema nervoso central foi avaliada seguindo a seguinte escala do QikProp de -2 (inativa) a +2 (ativa), seguindo esse parâmetro foi possível

observar que asiaticosideo, curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, ginkgolídeo A, ginkgolídeo B, ginkgolídeo C, bilobalide, luteolina, ácido rosmariníco, ácido salvianólico A, ácido salvianólico B e quercetina são inativas no SNC. Já as moléculas consideradas ativas foram: calebina-A, linalool e carvacrol, pois seguindo os parâmetros utilizados para análise demonstraram possuir boa atividade no sistema nervoso central. As moléculas com valores de referência mais próximas da molécula de referência fisostigmina (2) foram: calebina-A (1), linalool (1) e carvacrol (1).

A ligação de drogas à albumina sérica humana (HSA) influencia fortemente seu comportamento farmacocinético e está associada a questões de segurança de drogas, baixa depuração, baixa penetração cerebral, bem como interações medicamentosas. Assim, a predição *in silico* da ligação de HSA contribui significativamente para a descoberta de novos candidatos a drogas (VALLIANATOU; LAMBRINIDIS; TSANTILIKAKOULIDOU, 2013). De acordo com o QikProp, os valores de referência para avaliação da previsão de ligação à albumina sérica humana ( $\log K_{hsa}$ ) ficam entre -1,5 e 1,5. Analisando os dados contidos na tabela, pode-se verificar que nenhuma das moléculas apresentaram alta agregação à albumina sérica, as moléculas que apresentaram baixa agregação foram: asiaticosideo, curcumina demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, calebina-A, ginkgolídeo A, ginkgolídeo B, ginkgolídeo C, bilobalide, luteolina, ácido rosmariníco, geraniol, dihidrotanshinona, tanshinona I, metilenetanshinona, ácido salvianólico A, ácido salvianólico B e Quercetina. Já as que apresentaram média agregação foram: honokiol, linalool, carvacrol, criptotanshinona e rosmariquinona. As moléculas com valores de referência mais próximas da molécula de referência fisostigmina (-0.03) foram: calebina-A (-0.04), curcumina (-0.02), demetoxicurcumina (-0.05), bisdemetoxicurcumina (-0.07).

Dessa forma, os compostos que apresentaram os melhores resultados através da predição das propriedades farmacocinéticas, foram: calebina-A, carvacrol, luteolina, dihidrotanshinona, bisdemetoxicurcumina, criptotanshinona, metilenetanshinona e tanshinone I.

Com relação à predição de propriedades toxicológicas, é essencial empregar novas estratégias que possam prever o destino dos produtos químicos nos estágios iniciais de desenvolvimento para superar as taxas de falha e acelerar o desenvolvimento

e a aprovação de candidatos promissores. A toxicologia preditiva, mais comumente conhecida como toxicologia *in silico*, desempenha um papel fundamental na otimização de acertos por investigação paralela de segurança e atividade, permitindo assim um processo de desenvolvimento de drogas mais eficiente (BANERJEE, 2016).

Neste estudo, as análises de toxicidade foram realizadas em 24 moléculas, foi possível observar que 5 moléculas não apresentaram nenhum sinal de alerta quanto uma possível ação tóxica, 2 apresentaram somente um sinal de alerta, 2 apresentaram 2 sinais de alerta, 6 moléculas apresentaram 3 sinais de alerta, 6 delas apresentaram 4 sinais de alerta e 3 apresentaram 5 sinais de alerta demonstrando um perfil de toxicidade alto **Tabela 8**.

Os compostos que apresentaram os melhores resultados através da predição de propriedades toxicológicas, foram: dihidrotanshinona, criptotanshinona, rosmariquinona, carvacrol e calebina-A pois não apresentaram nenhum sinal de alerta.

Neste estudo, a molécula asiaticoside apresentou apenas um sinal de alerta, para sensibilização da pele. No estudo de Hausen (1993), foi estada a capacidade de sensibilização da *Centella asiatica* (extrato bruto) e seus constituintes triterpênicos asiaticoside, ácido asiático e ácido madecássico em cobaias, o próprio extrato, bem como os 3 ácidos, foram considerados sensibilizadores muito fracos.

Neste estudo, as moléculas ácido salvianólico A, ácido salvianólico B apresentaram um sinal de alerta para hepatotoxicidade. Em um estudo de Lin et al. (2015) que avaliou a capacidade de ácido salvianólico B de proteger contra hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol, induzindo a expressão de fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroid-2 (Nrf2). O pré-tratamento com ácido salvianólico B melhorou a lesão hepática aguda causada por paracetamol, conforme indicado pelos níveis de aspartato transaminase no sangue e achados histológicos, o que demonstra que os efeitos hepatotóxicos podem não ser significativos.

**Tabela 8** – Predição de propriedades toxicológicas dos produtos naturais estudados calculadas usando o software DEREK.

| Moléculas     | Hepatotoxic. | Nefrotoxic. | Sensibilid. cutânea | Carcinogenic. | Mutagenic. |
|---------------|--------------|-------------|---------------------|---------------|------------|
| Fisostigmina  | --           | --          | --                  | --            | --         |
| Asiaticosídeo | --           | --          | Terpenoid           | --            | --         |
| Curcumina     | --           | --          | Substituted phenol  | --            | --         |

|                                    |                                       |                                 |                                                                                                                  |       |                                   |
|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------------------------------|
|                                    |                                       |                                 | 1,3-Diketone,<br>alpha,beta-<br>Unsaturated<br>ketone or<br>precursor,<br>1,2-<br>Dihydroxybenzene<br>derivative |       |                                   |
| Demetoxicurcumina                  | --                                    | --                              | 1,3-Diketone,<br>alpha,beta-<br>Unsaturated<br>ketone or<br>precursor                                            | --    | --                                |
| Bisdemetoxicurcumina<br>Calebina-A | --                                    | --                              | Alkyl aldehyde<br>precursor                                                                                      | --    | Alkyl<br>aldehyde or<br>precursor |
| Ginkgolídeo A                      | --                                    | --                              | Alkyl aldehyde<br>precursor                                                                                      | --    | Alkyl<br>aldehyde or<br>precursor |
| Ginkgolídeo B                      | --                                    | --                              | Alkyl aldehyde<br>precursor                                                                                      | --    | Alkyl<br>aldehyde or<br>precursor |
| Ginkgolídeo C                      | --                                    | --                              | Alkyl aldehyde<br>precursor                                                                                      | --    | Alkyl<br>aldehyde or<br>precursor |
| Bilobalide                         | --                                    | --                              | Alkyl aldehyde<br>precursor                                                                                      | --    | Alkyl<br>aldehyde or<br>precursor |
| Honokiol                           | para-<br>Alkylphenol<br>or derivative | --                              | Substituted phenol                                                                                               | --    | --                                |
| Linalool                           | --                                    | Tertiary<br>alcohol or<br>ether | Terpenoid                                                                                                        | --    | --                                |
| Carvacrol                          | --                                    | --                              | --                                                                                                               | --    | --                                |
|                                    | --                                    | --                              | 1,2-<br>Dihydroxybenzene<br>or derivative,<br>Resorcinol or<br>precursor                                         | --    | --                                |
| Luteolina                          | --                                    | --                              | alpha,beta-<br>Unsaturated ester<br>or precursor                                                                 | --    | --                                |
| Ácido rosmarínico                  | para-<br>Alkylphenol<br>or derivative | --                              | Terpenoid                                                                                                        | --    | --                                |
| Geraniol                           | --                                    | --                              | --                                                                                                               | --    | --                                |
| Dihidrotanshinona                  | --                                    | --                              | --                                                                                                               | --    | --                                |
| Tanshinona I                       | Furan                                 | --                              | --                                                                                                               | Furan | --                                |
| Metilenetanshinona                 | Furan                                 | --                              | --                                                                                                               | Furan | --                                |
| Criptotanshinona                   | --                                    | --                              | --                                                                                                               | --    | --                                |
| Ácido salvianólico A               | para-<br>Alkylphenol<br>or derivative | --                              | alpha,beta-<br>Unsaturated ester<br>or precursor                                                                 | --    | --                                |

|                      |                                       |    |                                                                          |    |    |
|----------------------|---------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------|----|----|
|                      | para-<br>Alkylphenol<br>or derivative | -- | alpha,beta-<br>Unsaturated ester<br>or precursor                         | -- | -- |
| Ácido salvianólico B | --                                    | -- | --                                                                       | -- | -- |
| Rosmariquinona       | --                                    | -- | 1,2-<br>Dihydroxybenzene<br>or derivative,<br>Resorcinol or<br>precursor | -- | -- |
| Quercetina           |                                       |    |                                                                          |    |    |

## 5.6 PLANEJAMENTO DAS MODIFICAÇÕES

### 5.6.1 *Docking* molecular das modificações

Com objetivo de selecionar as moléculas que poderiam prosseguir no estudo, foi feita uma análise para identificar quais apresentaram os resultados satisfatórios nas etapas anteriores.

Observou-se que as moléculas calebina-A e quercetina tiveram valores de Homo aproximados da molécula de referência fisostigmina. Na análise do comportamento reativo das moléculas por meio dos mapas de potencial eletrostático molecular (MEPs), observou-se que o valor da molécula luteolina se aproximou da molécula de referência, tanto no potencial eletrostático positivo quanto negativo. Já no alinhamento das moléculas por meio do farmacóforo, foi possível observar que as moléculas luteolina e quercetina estão entre as 9 moléculas alinhadas, demonstrando possuírem características comuns. No estudo de *docking*, as moléculas calebina-A, luteolina e quercetina apresentaram resultados satisfatórios de score e de interações com os alvos. Com relação às predições de ADME/Tox, calebina-A e luteolina apresentaram resultados satisfatórios, sendo que a molécula calebina-A não apresentou qualquer sinal de alerta para toxicidade.

Por estes motivos, as moléculas calebina-A, luteolina e quercetina foram selecionadas como sendo compostos mais promissores considerando a análise dos estudos anteriores. Entretanto, ainda tiveram alguns pontos fracos em determinados parâmetros farmacocinéticos e de interação com as enzimas estudadas. Portanto, foram realizadas 10 modificações para cada uma destas, totalizando, então, 30 novas

moléculas derivadas do esqueleto original da luteolina, quercetina e calebina-A. Estas estruturas moleculares foram denominadas com o nome dos compostos padrão acrescentados de um número que vai de 1 a 10, como demonstrado nas **Figuras 9, 10 e 11** para as modificações de luteolina, quercetina e calebina-A, respectivamente.

Em seguida, estas 30 moléculas foram ancoradas dentro do sítio ativo das enzimas AChE e NOS, com intuito de verificar se houve maior número de interações, se estas foram realizadas com mais resíduos de aminoácidos e também comparar o GoldScore gerado pelas modificações e as moléculas padrões.

#### 5.6.1.1 *Docking* molecular entre a enzima AChE e as modificações

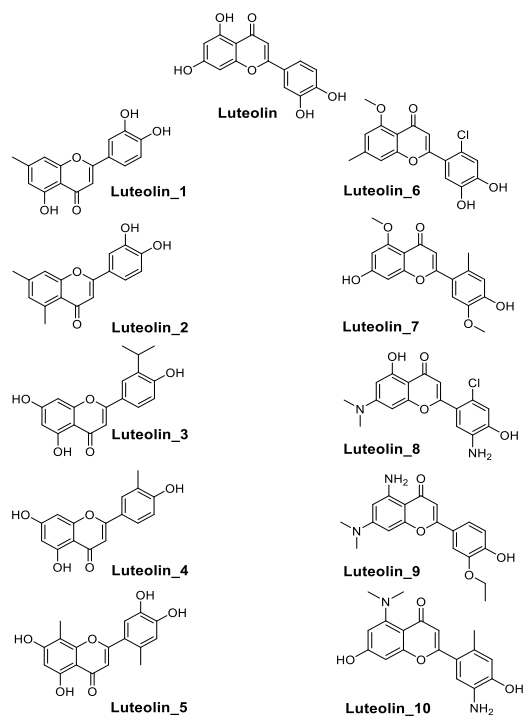
No *docking* realizado entre a luteolina o alvo AChE foi possível de se observar algumas interações importantes para a resposta desejada, as modificações foram realizadas para melhorar ainda mais essa provável ação sobre esse alvo.

O resultado de pontuação do Goldscore para cada modificação da luteolina\_1 à 10 foram, respectivamente, 74.59, 70.36, 72.50, 77.45, 68.21, 67.99 71.73, 77.06, 84.45 e 72.56. Apenas uma das modificações obteve um valor de score superior a molécula luteolina (score: 80.00), pivô, que foi a luteolina\_9 (score: 84.45). O restante todas obtiveram pontuações com valores inferiores a luteolina.

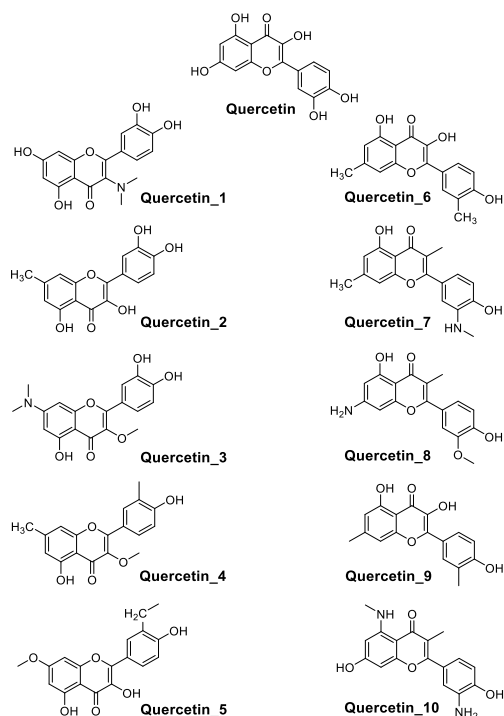
No *docking* realizado entre a luteolina e o AChE, foi possível observar 5 interações com o sítio de atividade, sendo 1 interação de hidrogênio com Asp74 e hidrofóbicas com Trp86. No *docking* da modificação luteolina\_9 foi possível se analisar 8 interações com os aminoácidos do sítio de interação (Gly121; Gly122; Tyr124; Phe295; Phe297; Tyr337; Phe338), sendo destas, 4 interações de hidrogênio e 4 interações hidrofóbicas.

Em outras palavras é notório que possivelmente a luteolina\_9 (**Figura 12 - A**) alcançou resultados mais positivos nesse *docking* que a própria estrutura padrão, isto é, a luteolina. Isso comprova que as modificações obtiveram resultados esperados e melhoraram ainda o entendimento dessa estrutura possivelmente desenvolver a resposta biológica esperada (CASTILHO, 2011).

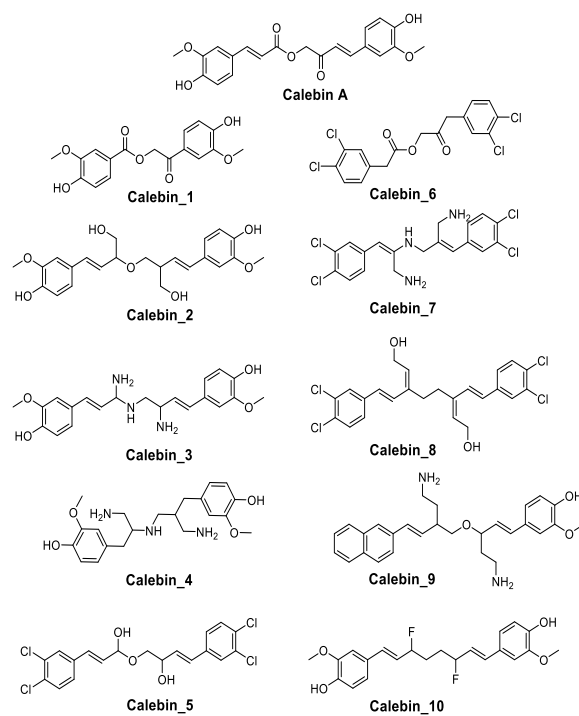
**Figura 9 – Análogos da luteolina.**



**Figura 10 – Análogos da quercetina.**



**Figura 11 – Análogos da calebina-A.**



As 10 modificações de quercetina foram avaliadas no sítio ativo da enzima AChE, relatado anteriormente, os resultados de GoldScore foram os seguintes para as modificações de quercetina\_1 a quercetina\_10: 66,18; 76,74; 62,74; 81,71; 79,19; 72,75; 68,09; 78,45; 72,87 e 70,72, respectivamente. As interações dos análogos de quercetina estão ilustradas na **Figura 12 - B**. Ficando o mais próximo do GoldScore da quercetina (82,14) a análogo quercetina\_4, com valor de 81,71.

Mesmo nenhum dos análogos obtendo um valor de GoldScore superior ao previsto para a molécula padrão de quercetina, o número de interações que estes análogos realizaram foram muito satisfatórios ao comparar com a própria quercetina, que apresentou apenas 3 pontos de interação, sendo uma do tipo de empilhamento  $\pi$  e as outras duas do tipo de hidrogênio, que é muito comum visualizar em estruturas de flavonóides devido a grande presença de hidroxilas. Sendo estas interações também presentes em todas as 10 modificações, alterando alguns outros tipos de interações hidrofóbicas e tendo alguns tipos de interações de hidrogênio não convencionais. Portanto, ao analisar qual a molécula que realiza mais interações fica ranqueada em primeiro lugar a quercetina\_3 e a 5 com um total de 19 interações, sendo 10 de hidrogênio com 9 hidrofóbicas para a primeira e 7 de hidrogênio com 12 hidrofóbicas para a segunda citada. Moléculas que realizam bastante interações hidrofóbicas e polares conseguem permeabilizar melhor o bolso ativo da AChE e agir com um propósito inibitório (MUGHAL et al., 2019).

Resíduos de aminoácidos chaves para a inibição da enzima em questão, como, Trp86, Glu202 e Ser125 são tidas como importantes no encaixe de moléculas que interagem com a AChE, porém a tríade catalítica é formada pelos resíduos Ser203, Tyr337 e His447, justamente estes três são os resíduos mais críticos para a avaliação de uma inibição na AChE (LI et al., 1999; KIAMETIS et al., 2017). Portanto, com exceção dos análogos quercetina\_1 e 2, os demais conseguiram realizar interações de hidrogênio ou algum tipo de hidrofóbica com pelo menos dois destes resíduos da tríade em questão, com destaque para a quercetina\_10 (**Figura 12 - B**) que realizou 14 interações no total, sendo 1 de hidrogênio com a Ser203, 1 empilhamento entre os elétrons  $\pi$  do seu anel conjugado e o anel da Tyr337 e mais 1 interação  $\pi$ -alquil entre o carbono do grupo amina e o ciclopentano da His447, sendo a única molécula a ter interações previstas para os

três aminoácidos reconhecidos da tríade de AChE. Mesmo a maioria não conseguindo o mesmo da quercetina\_10, suas interações foram com aminoácidos muito próximos, como exemplo, a maioria dos análogos não conseguiu realizar interações com a Ser203, porém sim com o resíduo vizinho – Glu202, que até mesmo a molécula da galantamina interage via interação de hidrogênio para exercer seu efeito inibitório (LI et al., 1999).

Vale ressaltar que a molécula padrão da quercetina, apesar do GoldScore mais elevado, não foi predita interagindo com nenhum desses três resíduos mencionados no parágrafo anterior, e nem mesmo com resíduos considerados próximos. Entretanto, os resíduos para o qual foram preditas as interações já foram vistos em métodos *in silico* também importantes para compostos flavonoides exercerem sua função inibitória, obviamente, não sendo os únicos resíduos responsável por isto (MUGHAL et al., 2019).

No que se refere aos valores de GoldScore de cada modificação da molécula calebina-A, indo de 1 a 10, foram os seguintes: 83,26; 101,92; 98,11; 104,65; 87,66; 89,61; 84,69; 94,92; 122,55 e 97,52, respectivamente. Sendo apenas as moléculas Calebina\_1, 5 e 7 com valores menores em relação a calebina-A, cujo foi de 89,26.

Todas as 10 modificações realizam um número de interações superior ao da calebina-A, além do número de resíduos de aminoácidos que interagiram também ter sido maior. Sendo o menor número de interações, em relação as modificações, 11 referente a Calebina\_7 e o maior referente a Calebina\_2 com 19, ambas demonstrando também um maior número de resíduos de aminoácidos ligados. É perceptível a melhora que houve nas interações da calebina-A com o sítio ativo da AChE devido as modificações terem sido realizadas na porção alifática de sua estrutura, principalmente. Justamente pelo intuito de propiciar um aumento no número de interações nesta região que para a calebina-A o resultado foi 0, tornando sua cadeia alifática mais curta, aumentando a distância dos grupos hidroxilas, realizando troca de grupos funcionais biososteros, aumentando os pontos que seriam favoráveis a mais interações de hidrogênio e até mesmo retirando as interações  $\pi$  para facilitar as rotações da molécula.

Devido a molécula da calebina-A ser maior, seus grupos funcionais conseguem alcançar mais resíduos de aminoácidos dentro do sítio ativo da AChE, assim como a donepezila em relação a galantamina (ambos utilizados em tratamento parkinsoniano), e realizar as devidas modificações a predição foi mais satisfatória para a maioria das

modificações. O grupo aromático de todas as modificações conseguiram realizar uma interação do tipo empilhamento  $\pi$  com o anel do resíduo de Trp86, sendo a molécula Calebina\_6 realizando até mesmo uma interação de hidrogênio com este aminoácido além do empilhamento  $\pi$  entre os anéis. Repetindo um padrão de interação do anel guaiacol presente na estrutura do inibidor de AChE de massa molar também semelhante a calebina-A. (CHEUNG et al., 2012).

Não somente este padrão foi semelhante, como também as interações com o meio da estrutura, a cadeia alifática, que na donepezila o nitrogênio do anel piridina na porção entre as duas regiões aromáticas realiza interações com os resíduos Tyr337 e Tyr341, sendo a mais semelhante a Calebina\_9 (**Figura 12 - C**), demonstrando interações com esses resíduos e suas duas regiões com nitrogênio, como é visto também na interação do átomo de nitrogênio presente na galantamina (CHEUNG et al., 2012). A consequência destas interações é a compactação do sítio ativo para uma maior acomodação da molécula.

Com exceção da Calebina\_3, todas as modificações demonstraram uma interação hidrofóbica ou interação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido His447, já com o resíduo Ser203 apenas as moléculas Calebina\_5 e 9 realizam uma interação de hidrogênio do tipo convencional e com o resíduo Glu334 nenhuma molécula foi predita, apenas com resíduos próximos. Estes três aminoácidos na cadeia lateral da AChE são denominados como a tríade catalítica responsável pela ação enzimática da enzima em questão na acetilcolina, logo um inibidor realizando impedimentos nestes aminoácidos seria muito interessante para sua ação, mesmo não sendo a única maneira de exercer seu papel farmacodinâmico (KIAMETIS et al., 2017).

#### 5.6.1.2 *Docking* molecular entre a enzima NOS e as modificações

No *docking* realizado entre o alvo NOS e as 10 modificações da luteolina, foi possível de se observar que todas as moléculas da série análoga apresentaram interações com algum dos aminoácidos do sítio de ação dessa enzima.

As pontuações do GoldScore para as modificações da luteolina nesse *docking*, da modificação 1 a 10, foram as seguintes: 81.61, 88.46, 80.32, 76.08, 75.47, 81.02, 65.78,

77.91, 81.15, 66.97, respectivamente. Dos resultados de score dos análogos, apenas a luteolina\_7 e a 10, respectivamente, tiveram resultados inferior a luteolina cujo score foi de 74.36. O melhor resultado do GoldScore nesse *docking* (88.46) foi da luteolina\_2 (**Figura 13 - A**) valor superior ao da molécula pivô luteolina.

A modificação luteolina\_2, também realizou interações com os aminoácidos do sítio de ativo, 3 dessas interações de hidrogênio e 2 hidrofóbicas com o aminoácido TRP372. O que mostra possível melhora na atividade sobre esse alvo em relação a luteolina, que não mostrou interações relevantes. No *docking* realizado com a Arginina, molécula ligante complexada com esse alvo no PDB, foi observado essa interação hidrofóbica com o TRP372, então em relação a modificação luteolina\_2 é provável que a mesma também, possua atividade sobre essa enzima, além disso realizou interações de hidrogênio, importantes para inibição desse alvo (KLATT et al., 1994).

Já nos resultados de *docking* das modificações da quercetina, demonstraram ser relevantes em relação a molécula pivô. Pois, apresentaram interações consideradas importantes para inibição dessa enzima, diferente da molécula quercetina que não demonstrou interação considerada de interesse nesse alvo.

Os resultados de pontuação das modificações apresentados pelo Goldscore desse *docking* foi de: 73.78, 73.29, 73.92, 78.87, 78.75, 88.05, 74.20, 70.25, 85.38, 60.83, respectivamente de quercetina\_1 à 10. Os análogos, nesse *docking* com exceção da quercetina\_10 (score: 60.83), obtiveram resultados de pontuação superiores a molécula pivô quercetina (score: 64.89), demonstrando possível afinidade e interação com esse alvo (TANVER et al., 2021).

O melhor resultado de score, ou seja, maior pontuação foi apresentado pela quercetina\_6 (obteve um valor score: 88.05), o qual é superior a própria quercetina. Suas interações com o sítio ativo da NOS pode ser visto na **Figura 13 - B**.

Nas figuras do *docking* molecular das modificações é possível de analisar que as moléculas conseguem realizar interações de hidrogênio, muitas dessas com aminoácidos que são importantes na inibição dessa enzima como: Gln263; Pro350; Trp372; Tyr373; Glu377 e Asp382 (LI et al., 1999).

No *docking* realizado entre esse alvo, a estrutura quercetina não demonstrou qualquer interação com os resíduos de aminoácidos considerados importantes para

inibição da NOS. Já a estrutura análoga quercetina\_6 (melhor resultado de pontuação) em relação a quercetina apresentou um total de 20 interações com a NOS, e ainda demonstrou interações considerada relevante nesse alvo (Trp372) 3 hidrofóbicas e uma de hidrogênio, semelhante a molécula complexada. O trabalho obteve sucesso, pois com esse análogo é notório que interações, consideradas de importância, realizam provável ação no alvo (LI et al., 1999).

Analisando os resultados das 10 modificações da calebina-A e sua ancoragem com a enzima NOS, foi possível prever interações de todas estas com o sítio ativo da enzima. Onde seus valores de GoldScore foi equivalente a, em ordem crescente das modificações: 74,94; 91,19; 86,75; 84,02; 87,28; 82,21; 90,47; 101,02; 102,58 e por último a calebina\_10 com 93,1. Sendo as moléculas calebina\_1, 3, 4, 5 e 6 com um GoldScore inferior ao pontuado anteriormente para a molécula padrão da calebina-A (89,26). Entretanto, todas as modificações exibiram um número de interações maior que dobro das vistas para a calebina-A.

Todas as 10 modificações realizaram interações do tipo hidrofóbica e do tipo de hidrogênio, sendo em algumas outras modificações contendo também uma interação do tipo eletrostática entre os resíduos Cys200, Met355, Glu377 e Met434 e o grupamento aromático da calebina\_1, 2, 4, 5 e 6. Esses resíduos são mais favoráveis a realizarem essas interações devido a região carboxílica presente no ácido glutâmico e o átomo de enxofre na estrutura da cisteína e da metionina, sendo muito interessante para uma atividade inibitória de enzimas, por se tratar de uma interação mais forte que as demais.

O maior propósito para as modificações estruturais na calebina-A era a melhora de suas interações com a NOS, assim como com a AChE, justamente como mencionado em parágrafos anteriores. Na porção alifática não estava sendo predita interações e assim apenas as duas regiões aromáticas estavam apresentando interações. Portanto, todas as 10 modificações cumpriram esse objetivo de garantir que a região entre os anéis guaiacóis pudessem realizar interações com resíduos do sítio ativo, sendo as moléculas com um maior número de interações nesta região: calebina\_2, 4, 7, 8, 9 e 10. Principalmente a molécula calebina\_10 que obteve 7 interações hidrofóbicas só nesta porção, justamente por não possuir nenhum grupamento eletronegativo como as demais

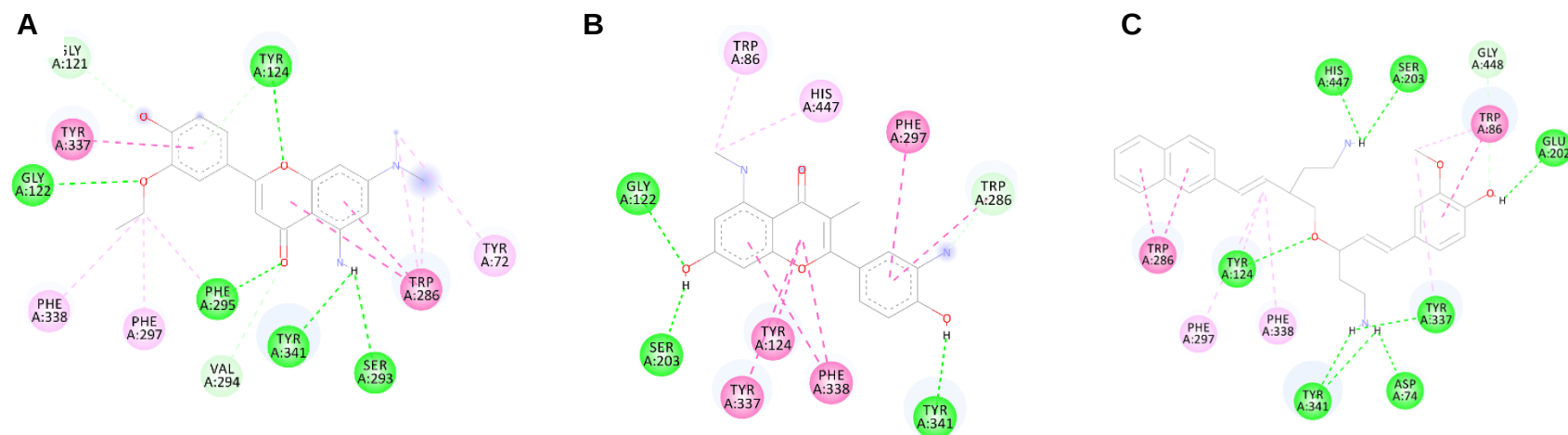
moléculas, demonstrando uma facilidade de grupos mais hidrofóbicos se estabelecerem neste sítio ativo.

O sítio ativo para inibidores de NOS, é composto por resíduos que se ligam a arginina e a circundam, tais como, Gln263, Arg266, Trp346, Pro350, Trp372, Tyr373, Glu377, Asp382 e Arg388. Dentro destes resíduos nenhuma das modificações, nem mesmo a própria calebina-A, realizaram interações com mais de dois resíduos. Apenas as moléculas calebina\_1 estabeleceu interação com os resíduos Trp372 e Glu377, calebina\_4 com Pro350 e Glu377 e a calebina\_7 (**Figura 13 - C**) com Pro350 e Glu377 também, ambas realizando interações de hidrogênio entre seus átomos de nitrogênio na cadeia alifática. Repetindo o padrão do grupo guanidino da arginina (LI et al., 1999). Com a calebina\_4 demonstrando até 3 interações de hidrogênio só com Glu377, sendo uma dessas na distância de 1,64Å, considerada uma interação forte de hidrogênio. Com isso fica claro a importância da porção de grupos aminas para este sítio ativo como já demonstrado na literatura (HALLINAN et al., 1998; NASH; SCHIEFER; SHAH, 2018).

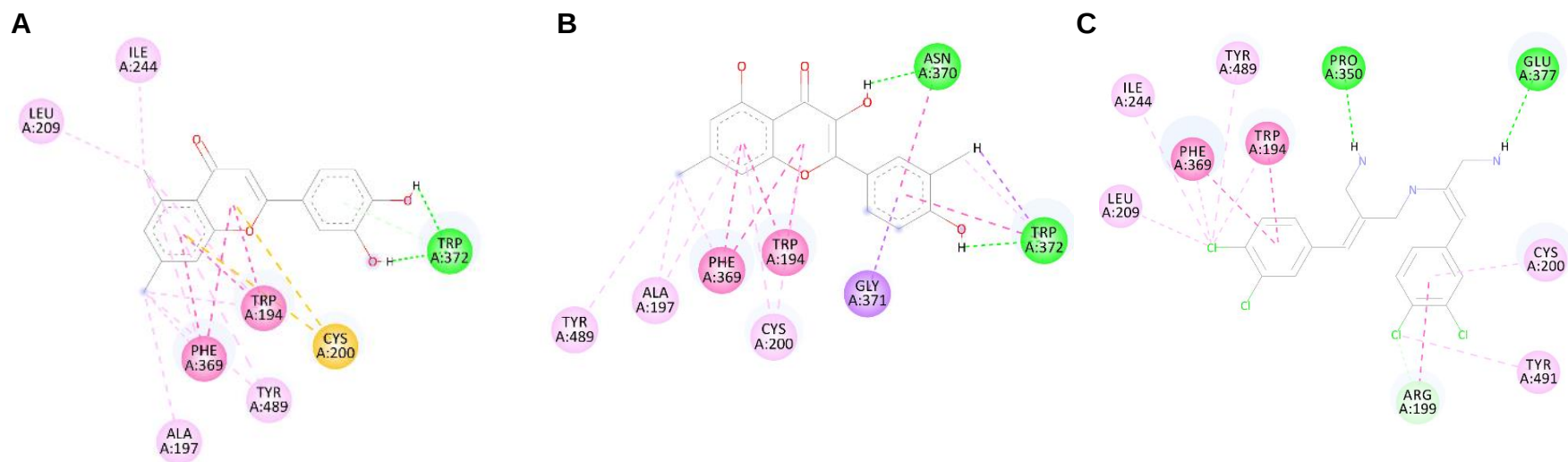
#### 5.6.1.3 Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) e toxicológicas (TOX) das modificações

Nas modificações foram retirados alguns grupos hidroxila e adicionaram-se grupos de metila (e outras cadeias carbônicas), ligações nitrogenadas (aminas) e foram adicionados grupos funcionais como éter e cetona, com o intuito de melhorar propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das moléculas selecionadas.

**Figura 12** – Interações intermoleculares entre AchE e A) luteolina\_9; B) quercetina\_10 e C) calebina\_9



**Figura 13** – Interações intermoleculares entre NOS e A) luteolina\_2; B) quercetina\_6 e C) calebina\_7



Nos parâmetros relacionados a absorção oral humana (%HOA e HOA) as modificações das moléculas luteolina e da quercetina apresentaram resultados superiores, sendo consideradas > 80% para %HOA. 5 análogos da luteolina (melhor resultado luteolina\_9, %HOA=93.34) e 6 análogos da quercetina (melhor resultado quercetina\_4, %HOA=100) obtiveram esses resultados, a calebina-A obteve resultados positivos em relação a absorção oral, apenas uma das suas modificações teve resultados semelhantes (calebina\_10). Dos resultados de HOA, todas modificações da luteolina (HOA=3) e quercetina (HOA=2) obtiveram valor HOA=3, demonstrando boa absorção, modificações da quercetina obtiveram melhora nesse parâmetro como mostra a **Tabela 9**.

Em relação as células Caco-2 e MDCK as moléculas luteolina e quercetina obtiveram valores que indicam baixa absorção, porém as suas modificações demonstraram mudanças positivas nessas propriedades. Todas as 10 moléculas análogas alcançaram valores superiores nos parâmetros de absorção em células Caco-2 e MDCK, sendo os melhores resultados, a luteolina\_9 (496.84) e quercetina\_4 (776.64) em Caco-2, e luteolina\_6 (325.00) e quercetina\_4 (376.43) em MDCK. A estrutura calebina-A já mostrava ter bons resultados de absorção pelo software e nem uma das suas modificações alcançou valores superiores nesses parâmetros.

As modificações preservaram os valores considerados positivos nas propriedades de logBB e SNC das moléculas luteolina, quercetina e calebina-A, que indicam resultados de penetração na barreira hematoencefálica e possível atividade no sistema nervoso central.

**Tabela 9** – Predição de propriedades farmacocinéticas das modificações da Luteolina, Quercetina e Calebina-A.

| MOLÉCULAS         | STAR | %HOA <sup>(a)</sup> | pCaco-2 <sup>(b)</sup> | pMDCK <sup>(c)</sup> | HOA <sup>(d)</sup> | LogBB <sup>(e)</sup> | SNC | LogK <sub>hSA</sub> |
|-------------------|------|---------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|-----|---------------------|
| <b>Luteolina</b>  | 0    | 61.87               | 45.24                  | 17.42                | 3                  | -1.89                | -2  | -0.22               |
| Luteolina_1       | 0    | 77.21               | 151.72                 | 64.44                | 3                  | -1.37                | -2  | 0.07                |
| Luteolina_2       | 0    | 88.03               | 442.07                 | 204.72               | 3                  | -0.87                | -1  | 0.15                |
| Luteolina_3       | 0    | 84.35               | 219.61                 | 96.10                | 3                  | -1.33                | -2  | 0.28                |
| Luteolina_4       | 0    | 77.93               | 164.04                 | 70.11                | 3                  | -1.33                | -2  | 0.07                |
| Luteolina_5       | 0    | 66.89               | 58.01                  | 22.79                | 3                  | -1.77                | -2  | -0.00               |
| Luteolina_6       | 0    | 87.93               | 374.69                 | 325.00               | 3                  | -0.90                | -1  | 0.15                |
| Luteolina_7       | 0    | 87.85               | 454.54                 | 210.97               | 3                  | -0.95                | -1  | 0.06                |
| Luteolina_8       | 0    | 78.13               | 131.82                 | 104.70               | 3                  | -1.43                | -2  | 0.14                |
| Luteolina_9       | 0    | 93.34               | 496.84                 | 232.27               | 3                  | -1.10                | -2  | 0.32                |
| Luteolina_10      | 0    | 75.22               | 148.36                 | 62.90                | 3                  | -1.44                | -2  | -0.03               |
| <b>Quercetina</b> | 0    | 53.42               | 23.51                  | 8.59                 | 2                  | -2.21                | -2  | -0.38               |
| Quercetina_1      | 0    | 70.82               | 92.03                  | 37.54                | 3                  | -1.71                | -2  | -0.08               |

|                   |   |        |          |         |   |       |    |       |
|-------------------|---|--------|----------|---------|---|-------|----|-------|
| Quercetina_2      | 0 | 68.11  | 74.42    | 29.83   | 3 | -1.73 | -2 | -0.10 |
| Quercetina_3      | 0 | 82.30  | 224.32   | 98.33   | 3 | -1.37 | -2 | 0.10  |
| Quercetina_4      | 0 | 100    | 776.64   | 376.43  | 3 | -0.67 | 0  | 0.37  |
| Quercetina_5      | 0 | 86.77  | 317.35   | 143.08  | 3 | -1.22 | -2 | 0.17  |
| Quercetina_6      | 0 | 83.91  | 258.22   | 114.49  | 3 | -1.17 | -2 | 0.20  |
| Quercetina_7      | 0 | 89.66  | 396.15   | 181.84  | 3 | -1.00 | -2 | 0.32  |
| Quercetina_8      | 0 | 79.20  | 198.87   | 86.33   | 3 | -1.29 | -2 | 0.01  |
| Quercetina_9      | 0 | 83.89  | 257.94   | 114.36  | 3 | -1.17 | -2 | 0.20  |
| Quercetina_10     | 0 | 72.70  | 112.13   | 46.47   | 3 | -1.58 | -2 | -0.05 |
| <b>Calebina-A</b> | 0 | 100    | 3814.53  | 2102.90 | 3 | 0.08  | 1  | 0.04  |
| Calebina_1        | 0 | 75.00  | 193.22   | 83.68   | 3 | -1.78 | -2 | -0.29 |
| Calebina_2        | 1 | 88.21  | 148.86   | 63.13   | 3 | -2.14 | -2 | -0.10 |
| Calebina_3        | 2 | 23.13  | 277.38   | 123.70  | 1 | -1.63 | -2 | -0.25 |
| Calebina_4        | 3 | 23.22  | 1.931    | 0.780   | 1 | -1.45 | -2 | -0.37 |
| Calebina_5        | 1 | 100.00 | 2.290    | 0.938   | 1 | -0.01 | 0  | 0.44  |
| Calebina_6        | 2 | 96.21  | 2.442.24 | 10000   | 1 | -0.35 | 0  | 0.52  |
| Calebina_7        | 1 | 84.95  | 71.881   | 887.28  | 2 | 0.39  | 1  | 0.47  |
| Calebina_8        | 4 | 100    | 860.48   | 10000   | 1 | -0.89 | -1 | 1.18  |
| Calebina_9        | 1 | 68.47  | 16.75    | 7.28    | 2 | -1.16 | -2 | 0.44  |
| Calebina_10       | 0 | 100    | 1245.96  | 1261.76 | 1 | -0.98 | -1 | 0.83  |

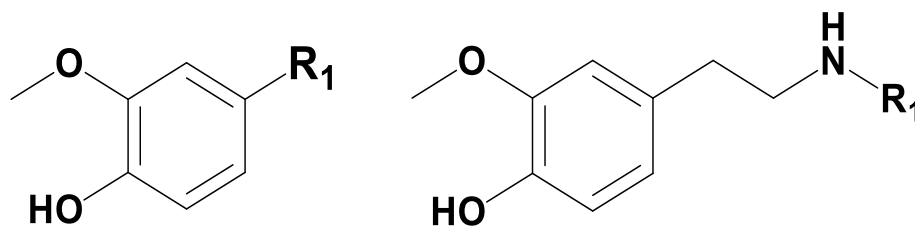
[a] Percent Human oral absorption. [b] Cell permeability in Caco-2. [c] Cell permeability MDCK. [d] Human Oral absorption [e] Penetration of the blood-brain barrier.

Os valores de logK<sub>HS</sub>A das três estruturas pivô (luteolina, quercetina e calebina-A) e das estruturas análogas demonstraram resultados dentro da faixa, o que mostra possível agregação a albumina sérica. Essa interação pode representar uma boa depuração desses fármacos, embora fármacos que se ligam fortemente a essa proteína possuem interações medicamentosas, pois a mesma é uma das principais proteínas carreadoras no plasma sanguíneo.

#### Predição de propriedades de toxicidade de análogos (luteolina, quercetina e calebina-A)

Os resultados da predição de toxicidade para os análogos da calebina-A, luteolina e quercetina estão expressos na **tabela 10**. A discussão desta pesquisa se iniciará pela calebina-A por seus análogos terem demonstrado mais pontos de alerta nesta predição, principalmente pelo motivo da calebina-A em si ser bem divergente da estrutura flavonóica da luteolina e quercetina.

O último alerta do tipo plausível foi referente a hepatotoxicidade na molécula calebina\_4. Sendo o toxicóforo responsável os grupos derivados de p-Alquilfenol e feniletilamina, demonstrados na **Figura 14** cada estrutura na direita e na esquerda, respectivamente.



**Figura 14** – Estruturas responsáveis por alerta plausível em hepatotoxicidade.

O alerta para esses grupamentos presente na estrutura molecular da calebina\_4 surgiram devido a capacidade de derivados p-alkilfenol formar metetos de quinona reativas, com capacidade de formação de complexos covalentes com enzimas celulares ou até mesmo com o DNA, sendo o principal mecanismo de toxicidade dos compostos que possuem seu esqueleto molecular baseado em alquil-fenóis, como o cresol, eugenol e hidroxitolueno butilado (THOMPSON; PERERA; LONDON, 1995). Este último é relatado até mesmo tendo uma alta acumulação no tecido hepático e capacidade de seus metabólitos (metetos de quinona) induzirem neoplasias no pulmão e na pele (ZHANG; LI; CUI, 2020). Em relação ao segundo grupo acusado como hepatotóxico presente na molécula calebina\_4, está presente em muitas drogas com a função amina, como a própria droga de abuso metafetamina, e sua relação estrutural com hepatotoxicidade não está completamente elucidado, porém é evidenciado que em modelos animais os derivados de fetilfenilamina tem a capacidade de produzir citotoxicidade em hepatócitos, dependendo da dose (WANG et al., 2017). Todavia, a molécula calebina\_4 possui em sua estrutura molecular fragmentos tidos como derivados dos grupos citados muito mais complexos em relação a estrutura no geral, por exemplo, o grupo de metilamina no carbono 12 e 14.

Os outros alertas foram todos do tipo ambíguo o que significa para o software que o nível das evidências para ser predito como tóxico não é tão distante das evidências para ser predito como atóxico. Logo, foram 3 moléculas (calebina\_2, 5 e 6) marcadas com este alerta para nefrotoxicidade, sendo o grupo toxicofórico marcador derivados de dihidroxi-propano/etano e benzeno halogenado.

O alerta ambíguo chamou muita atenção nas moléculas calebina\_5, 7 e 8 por ter sido no parâmetro de carcinogenicidade, por consequência do grupamento dicloro-benzeno em posição orto. A literatura científica não tem dados suficientes para embasar um perfil claro de toxicidade nem para os derivados desta estrutura

molecular, como por exemplo o para-dicloro benzeno e seus metabólitos é tóxico, porém depende da dose e se demonstrou mais tóxico a camundongos em relação a ratos. Não tendo capacidade de formar crescimento celular anormal em hepatócitos de ratos machos e fêmeas (AISO et al., 2005; DUBEY et al., 2014). Isso demonstra a necessidade de um estudo mais aprofundado em halogenetos de benzeno em relação a capacidade de formar metabólitos reativos, também mantém os pesquisadores em estado de atenção caso as moléculas citadas no início do parágrafo forem para ensaios de bancada.

O resultado ambíguo para inibição de canais HERG para a calebina\_3 e 4 possivelmente devido a porção nitrogenada em seus esqueletos moleculares, onde estes podem repetir a ação de outros fármacos já estudados para a toxicidade cardíaca em que seus átomos de nitrogênio protonam e formam interações fortes com resíduos de aminoácidos importantes para a inibição de atividade do canal. Entretanto, as evidências não são muito claras e depende muito de cada descritor molecular das estruturas (HELLIWELL et al., 2018; YUAN et al., 2018).

No que se refere as modificações estruturais das moléculas quercetina e luteolina, estas sofreram poucos alertas pelo software DEREK. Sendo o alerta em comum a todas a sensibilidade cutânea, devido ao mesmo grupamento toxicofórico das modificações da calebina-A - 1, 2-Dihidroxi benzeno – comum muitos derivados deste grupamento estarem presentes nas estruturas padrões de flavonoides. O mecanismo pelo qual se explica a provável sensibilidade cutânea é o mesmo que está descrito para as modificações de calebina-A.

As marcações de plausível (luteolina\_5) e ambíguo (luteolina\_8 e 10) em hepatotoxicidade foram devidas aos fragmentos p-alquilfenol e aminofenol, respectivamente. Assim como para a calebina\_4 e luteolina\_5 apresentou a hepatotoxicidade para um derivado de p-alquilfenol, podendo causar danos através dos mesmos mecanismos explicados. Agora levando em consideração as modificações luteolina\_8 e 10 e até mesmo as modificações Quercetin\_8 e 10, todas estas levantaram um grau de risco de hepatotoxicidade para o mesmo fragmento de aminofenol, mudando apenas as posições da hidroxila e da amina entre orto e meta. O grupo aminofenol é relatado como um alerta ambíguo devido os dados na literatura apoiarem fortemente o mecanismo hepatotóxico sendo a formação de metabólitos que em condições normais são facilmente excretados pela GSH, entretanto quando a GSH

não consegue suportar as concentrações mais elevadas destes metabólitos então estes iniciam uma cascata de estresse oxidativo devido a ligações covalentes com proteínas de membrana e proteínas mitocondriais, consequentemente levando a disfunção celular no tecido hepático (ISHITSUKA; KONDO; KADOWAKI, 2020). No entanto, como relatado, isto ocorre principalmente em situações de concentrações elevadas de moléculas que contenham derivados de aminofenol e em momentos de diminuição da molécula GSH, sendo necessário estudos de doses letais para melhorar as evidências sobre as modificações luteolina\_8, 10 e quercetina\_8, 10.

Os resultados de carcinogenicidade foram preditos como plausíveis apenas para as estruturas luteolina\_10 e quercetina\_10, devido a presença do anel conjugado tendo um grupo lateral de amina – derivado de uma amina aromática, sendo a porção da estrutura molecular responsável também pelo alerta da mutagenicidade, porém marcada como ambíguo. Estes grupamentos apresentam forte evidências de danos causados ao material genético, principalmente em zonas laborais de exposição prolongada, devido também a formação de metabólitos pelas hepato-enzimas do complexo P450. Porém essa formação de carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos derivados de aminas aromáticas está mais relacionado a estruturas de pequeno peso molecular, tais como exemplos muito bem vistos, anilina, o-nitroanisol, o-anisidina e 4-aminobifenil (WANG et al., 2019; DEMARINI et al., 2020). Logo este resultado, assim como os demais, entrega pistas muito oportunas de prováveis pontos e mecanismos toxicológicos destas modificações, guiando assim os futuros estudos de avaliação *in vivo*.

**Tabela 10** – Predição de propriedades toxicológicas das modificações da Luteolina, Quercetina e Calebina-A.

| Molécula          | Hepatotoxi<br>c. | Nefrotoxic. | Sensibilid.<br>cutânea | Carcinogeni<br>c. | Mutageni<br>c. | Inibição<br>HERG |
|-------------------|------------------|-------------|------------------------|-------------------|----------------|------------------|
| <b>Luteolina</b>  | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_1       | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_2       | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_3       | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_4       | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_5       | Plausível        | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_6       | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_7       | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_8       | Ambíguo          | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_9       | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |
| Luteolina_10      | Ambíguo          | --          | Plausível              | Plausível         | Ambíguo        | --               |
| <b>Quercetina</b> | --               | --          | Plausível              | --                | --             | --               |

|                   |           |         |           |           |         |         |
|-------------------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|---------|
| Quercetina_1      | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Quercetina_2      | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Quercetina_3      | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Quercetina_4      | --        | --      | Ambíguo   | --        | --      | --      |
| Quercetina_5      | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Quercetina_6      | --        | --      | Ambíguo   | --        | --      | --      |
| Quercetina_7      | Ambíguo   | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Quercetina_8      | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Quercetina_9      | --        | --      | Ambíguo   | --        | --      | --      |
| Quercetina_10     | Ambíguo   | --      | Plausível | Plausível | Ambíguo | --      |
| <b>Calebina-A</b> | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Calebina_1        | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Calebina_2        | --        | Ambíguo | Plausível | --        | --      | --      |
| Calebina_3        | --        | --      | Plausível | --        | --      | Ambíguo |
| Calebina_4        | Plausível | --      | Plausível | --        | --      | Ambíguo |
| Calebina_5        | --        | Ambíguo | Plausível | Ambíguo   | --      | --      |
| Calebina_6        | --        | Ambíguo | --        | --        | --      | --      |
| Calebina_7        | --        | --      | --        | Ambíguo   | --      | --      |
| Calebina_8        | --        | --      | --        | Ambíguo   | --      | --      |
| Calebina_9        | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |
| Calebina_10       | --        | --      | Plausível | --        | --      | --      |

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

---

A química computacional é aliada no sentido de prever possíveis interações com o alvo biológico de interesse, sendo extremamente importante quando se pensa em novas alternativas para o tratamento da doença de Alzheimer, visto que, o atual tratamento disponível envolve vários efeitos colaterais para os pacientes. Além disso, é uma doença multifatorial, com os mecanismos de surgimento ainda não elucidados completamente, tornando-se assim um desafio para os pesquisadores. Dessa forma, o planejamento de novos fármacos é fundamental para proporcionar melhor qualidade de vida, diminuindo os sintomas, evitando os efeitos adversos e retardando a progressão da doença.

Neste estudo, os compostos que apresentaram os resultados mais satisfatórios nas predições de propriedades moleculares, padrão farmacofórico, *docking* molecular, propriedades farmacocinéticas e toxicológicas foram selecionadas como protótipos para o planejamento de candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer: calebina-A, luteolina e quercetina. A maioria das modificações obtiveram resultados de *docking* molecular superior as suas estruturas padrões. Sendo destaque os análogos luteolina\_2, quercetina\_6 e calebina\_9, por terem interações favoráveis tanto com AChE e NOS. Em relação ao perfil farmacocinético avaliado entre as três estruturas, apenas a calebina\_9, obteve valores desfavoráveis em relação a sua absorção predita em células Caco-2 e MDCK. No que se refere ao perfil toxicológico *in silico* nenhum dos três análogos se obtiveram um alerta de atenção muito desfavorável. Contudo, conclui-se que estas três modificações de luteolina, quercetina e calebina-A são estruturas potenciais na avaliação de inibição enzimática da AChE e NOS, podendo contribuir na para o tratamento da doença de Alzheimer.

ABDUL MANAP, Aimi Syamima et al. Synergistic Effects of Curcumin and Piperine as Potent Acetylcholine and Amyloidogenic Inhibitors With Significant Neuroprotective Activity in SH-SY5Y Cells via Computational Molecular Modeling and in vitro Assay. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, p. 206, 2019.

ALSO, S. et al. Carcinogenicity and chronic toxicity in mice and rats exposed by inhalation to para-dichlorobenzene for two years. *The Journal of veterinary medical science*, v. 67, n. 10, p. 1019–1029, 2005.

ALAM, Mahboob; PARK, Soonheum. Molecular structure, spectral studies, NBO, HOMO–LUMO profile, MEP and Mulliken analysis of 3 $\beta$ , 6 $\beta$ -dichloro-5 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholestane. *Journal of Molecular Structure*, v. 1159, p. 33-45, 2018.

ALDER,V.; PINCUS,M.R.; UPADHYAYA,S.P.P.; BAYOUMY, K.;RONAI,Z. Effect of chemopreventive selenium compounds com Jun N-Kinase activities. **Carcinogeneseis**,v.17,n.9,p.1846-1854,1996.

ALOKAM, Reshma et al. Identification and structure–activity relationship study of carvacrol derivatives as Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, v. 29, n. 4, p. 547-554, 2014.

ARROIO, Agnaldo; HONORIO, Káthia M.; SILVA, Albérico B. F. da. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010040422010000300037&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422010000300037&lng=en&nrm=iso)>. access on 05 May 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300037>.

ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

ATRI, A. Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease.**Seminars in neurology**.New York, v6n1, p.227-240, Apr, 2019.

BANERJEE, Priyanka et al. Computational methods for prediction of in vitro effects of new chemical structures. *Journal of cheminformatics*, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2016.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank.**Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BERNARDO, L. D.Idosos com doença de Alzheimer:uma revisão sistemática sobre a intervenção da Terapia Ocupacional nas alterações em habilidades de

desempenho. **Cad. Bras. Ter. Ocup.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ, Rio de Janeiro, São Carlos, v. 26, n. 4, p. 926-942, 2018.

BRIGGS, R.; KENNELLY, S.P.; O'NEILL, D. Drug treatments in Alzheimer's disease. **Clinical medicine**. V.1, p.247-53. Jun,2016.

BUKHARI, Syed Nasir Abbas et al. Pharmacological evaluation and docking studies of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl based synthetic compounds as inhibitors of secretory phospholipase A2, cyclooxygenases, lipoxygenase and proinflammatory cytokines. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 15, p. 4151-4161, 2014.

BUOLAMWINI, John K.; ASSEFA, Haregewein. CoMFA and CoMSIA 3D QSAR and docking studies on conformationally-restrained cinnamoyl HIV-1 integrase inhibitors: exploration of a binding mode at the active site. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 4, p. 841-852, 2002.

CARDOSO, F.J.B.; COSTA, R.B.; FIGUEIREDO, A.F; BARBOSA, J.P.; NAVA JUNIOR, I.; PINHEIRO, J.C.; ROMERO, O.A.S. Modeling artemisinin derivatives with potent activity against *P. falciparum* malaria with ab initio and PLS methods. **Int. Electron. J. Mol. Des.**, v. 6, n.5, p. 122–134, 2007.

CASTILHO, Luis Nelson Prado. Docking molecular aplicado ao estudo da formação de complexos entre análogos de resveratrol e derivados de 1, 2, 3-triazol e a enzima COX-2. 2011.

CHEMPLUS. Modular Extensions for HyperChem Release 6.02. Molecular Modeling for Windows, **HyperClub, Inc.**, Gainesville, 2000.

CHEN, Calvin R.; MAKHATADZE, George I. ProteinVolume: calculating molecular van der Waals and void volumes in proteins. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2015.

CHEN, PT.; CHEN, ZT.; HOU, WC.; YU, LC.; CHEN, RP. Polyhydroxycurcuminoids but not curcumin upregulate neprilysin and can be applied to the prevention of Alzheimer's disease. **Scientific reports**. V.1, p.13. Jul, 2016.

CHEUNG, J. et al. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282–10286, 2012.

CUNHA, E. L. et al. Computational investigation of antifungal compounds using molecular modeling and prediction of ADME/Tox properties. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**, v. 12, n. 10, p. 3682-3691, 2015.

DA S HAGE-MELIM, Lorane I. et al. The impact of natural compounds on the treatment of neurodegenerative diseases. **Current Organic Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 335-360, 2019.

DE OLIVEIRA, Nayana Keyla Seabra et al. Molecular Docking, Physicochemical Properties, Pharmacokinetics and Toxicity of Flavonoids Present in Euterpe Oleracea Martius. **Current Computer-aided Drug Design**, 2020.

DEMARINI, D. M. ET AL. Carcinogenicity of some aromatic amines and related compounds. *The lancet oncology*, v. 21, n. 8, p. 1017–1018, 2020.

DIAS, Kris Simone T. et al. Aplicações recentes da abordagem de fármacos multialvo para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 609-648, 2015.

DÖRWALD, F. Z.. **Lead optimization for medicinal chemists: pharmacokinetic properties of functional groups and organic compounds**. John Wiley e Sons, 2012.

DÖRWALD, Florencio Zaragoza. **Lead optimization for medicinal chemists: pharmacokinetic properties of functional groups and organic compounds**. John Wiley & Sons, 2012.

DUBEY, D. et al. Para-dichlorobenzene toxicity - a review of potential neurotoxic manifestations. *Therapeutic advances in neurological disorders*, v. 7, n. 3, p. 177–187, 2014.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; JUNIOR, V. A.; FEATHERSTONER, M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**. V. 7, n. 2, p. 88-90, 1961.

ESTRADA, E.; MOLINA, E. Novel local (fragment – based) topological molecular descriptors for QSPR-QSAR and molecular design. **Journal of Molecular Graphics and modelling** 20. p. 54-74, 2001.

FALCO, ANNA DE et al. DOENÇA DE ALZHEIMER: HIPÓTESES ETIOLÓGICAS E PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 63-80, Jan. 2016.

FLUKIGER, P. MOLEKEL 4.2: **Swiss Center for Scientific Computing**, Manosque, Switzerland, 2002.

FOTOUHI, L. et al. Electrochemically induced Michael addition reaction: An overview. *Chemical record (New York, N.Y.)*, v. 18, n. 11, p. 1633–1657, 2018.

FRISCH, M. J. G.; TRUCKS, W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A.; VREVEN, JR. T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; Mennucci, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.;

POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOŚLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; M. WONG, W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A.

Gaussian 03, Revision A.1; Gaussian, Inc.: Pittsburgh PA, 2003.

GANJI, Santhi et al. A Selective Murine Intestinal Alkaline Phosphatase (mIAP) Inhibitor. In: Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US), 2013.

GODYŃ, Justyna et al. Lipophilic properties of anti-Alzheimer's agents determined by micellar electrokinetic chromatography and reversed-phase thin-layer chromatography. *Electrophoresis*, v. 38, n. 9-10, p. 1268-1275, 2017.

GOYAL, MEGH R.; CHAUHAN, DURGESH NANDINI (Ed.). Plant-and Marine-based Phytochemicals for Human Health: Attributes, Potential, and Use. CRC Press, 2018.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av.**, São Paulo , v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUPTA, S.; MOHAN, C. G. Dual binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors derived from integrated pharmacophore models and sequential virtual screening. **Biomed Res Int**, v. 2014, 21p., 2014.

HABTEMARIAM, S. Molecular Pharmacology of Rosmarinic and Salvianolic Acids: Potential Seeds for Alzheimer's and Vascular Dementia Drugs. **International journal of molecular sciences**.V.9, Feb, 2018.

HALLINAN, E. A. et al. Acetamidine lysine derivative, N-(5(S)-amino-6,7-dihydroxyheptyl)ethanimidamide dihydrochloride: a highly selective inhibitor of human inducible nitric oxide synthase. *Journal of medicinal chemistry*, v. 41, n. 6, p. 775–777, 1998.

HAUSEN, B. M. Centella asiatica (Indian pennywort), an effective therapeutic but a weak sensitizer. *Contact dermatitis*, v. 29, n. 4, p. 175-179, 1993.

HE, Zhi-Zhou et al. Chemical constituents from the aerial parts of Artemisia minor. *Journal of natural products*, v. 72, n. 6, p. 1198-1201, 2009.

HELLIWELL, M. V. et al. Structural implications of hERG K<sup>+</sup> channel block by a high-affinity minimally structured blocker. *The journal of biological chemistry*, v. 293, n. 18, p. 7040–7057, 2018.

HOU, T. J.; XU, X. J. ADME evaluation in drug discovery. 3. Modeling blood-brain

barrier partitioning using simple molecular descriptors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 43, n. 6, p. 2137-2152, 2003.

ISHITSUKA, Y.; KONDO, Y.; KADOWAKI, D. Toxicological property of acetaminophen: The dark side of a safe antipyretic/analgesic drug? *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 43, n. 2, p. 195–206, 2020.

JENSEN, Anders A. et al. Probing the pharmacophore of ginkgolides as glycine receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry*, v. 50, n. 7, p. 1610-1617, 2007.

JIANG, Yingying; GAO, Hongwei. Pharmacophore-based drug design for potential AChE inhibitors from Traditional Chinese Medicine Database. *Bioorganic Chemistry*, v. 76, p. 400-414, 2018.

JUNG, H.; AMAN, W.; HAH, JM. Novel scaffold evolution through combinatorial 3D-QSAR model studies of two types of JNK3 inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. Oxford; New York, v8n1, May, 2017.

JUNG, HYUN AH; OH, SANG HO; CHOI, JAE SUE. Molecular docking studies of phlorotannins from *Eisenia bicyclis* with BACE1 inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 20, n. 11, p. 3211-3215, 2010.

KEEMINK, Janneke; BERGSTRÖM, Christel AS. Caco-2 cell conditions enabling studies of drug absorption from digestible lipid-based formulations. *Pharmaceutical research*, v. 35, n. 4, p. 74, 2018.

KELDENICH, Joerg. Measurement and prediction of oral absorption. *Chemistry & biodiversity*, v. 6, n. 11, p. 2000-2013, 2009.

KHAN, Mahmud Tareq Hassan et al. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions*, v. 181, n. 3, p. 383-389, 2009.

KIAMETIS, A. S. et al. Potential acetylcholinesterase inhibitors: molecular docking, molecular dynamics, and in silico prediction. *Journal of molecular modeling*, v. 23, n. 2, p. 67, 2017.

KIM, H.; HAN, H. Computer-Aided Multi-Target Management of Emergent Alzheimer's Disease. **Bioinformation**. V.1,p. 167-180. May,2018.

KLATT, Peter et al. The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity, and allosteric interaction with the substrate domain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 19, p. 13861-13866, 1994.

KOES, David Ryan; CAMACHO, Carlos J. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic acids research*, v. 40, n. W1, p. W409-W414, 2012.

KOES, David Ryan; CAMACHO, Carlos J. ZINCPharmer: pharmacophore search of

the ZINC database. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W409-W414, 2012.

KOUKOULITSA, Catherine et al. Inhibitory effect on soybean lipoxygenase and docking studies of some secondary metabolites, isolated from *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, v. 22, n. 1, p. 99-104, 2007.

KUTLUSHINA, Alina et al. Ligand-based pharmacophore modeling using novel 3D pharmacophore signatures. *Molecules*, v. 23, n. 12, p. 3094, 2018.

LEE, M.H.; BALUPURI A.; JUNG, Y.R.; CHOI, S.; LEE, A.; CHO, Y.S.; KANG, N.S. Design of a Novel and Selective IRAK4 Inhibitor Using Topological Water Network Analysis and Molecular Modeling Approaches. **Molecules**.V.6, p.29-23Nov, 2018.

LEMOIS, L.; JUNYENT, F.; VERDAGUER, E.; FOLCH, J.; ROMERO, R.; PALLÀS, M.; FERRER, I.; ALADELL, C.; CAMINS, A. Differences in activation of ERK1/2 and p38 Kinase in Jnk3 null mice following KA treatment. *International Society for Neurochemistry. Journal of Neurochemistry*, p. 1315–1322, v.12,n.6, 2010.

LI, H. et al. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase: Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *The journal of biological chemistry*, v. 274, n. 30, p. 21276–21284, 1999.

LIN, Musen et al. Salvianolic acid B protects against acetaminophen hepatotoxicity by inducing Nrf2 and phase II detoxification gene expression via activation of the PI3K and PKC signaling pathways. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 127, n. 2, p. 203-210, 2015.

LIU, Q.; WU, H.; CHIM, S.M.; ZHOU, L.; ZHAO, J.; FENG, H.; WEI, Q.; WANG, Q.; ZHENG, M.H.; TAN, R.X.; GU, Q.; XU, J. PAVLOS N.; TICKNER, J.; XU, J. SC-514, a selective inhibitor of IKK $\beta$  attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis and NF- $\kappa$ B activation. **Biochemical pharmacology**, v.1,n.4,p. 1775-1783, Oxford, New York, Dec 15. 2018.

LIU, Wei et al. Identification of cryptotanshinone as an inhibitor of oncogenic protein tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11). *Journal of medicinal chemistry*, v. 56, n. 18, p. 7212-7221, 2013.

LUQUE-CONTRERAS, D.; CARVAJAL, K.; TORAL-RIOS, D.; FRANCO-BOCANEGRA, D.; CAMPOS-PEÑA, V. Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease? **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.1,n.1, p.11, Jan, 2014.

MELLES, D. et al. In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v. 913–914, p. 106–112, 2013.

MESQUITA, Bruna M. de et al. SYNTHESIS, LARVICIDAL AND ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITIES OF CARVACROL/THYMOL AND DERIVATIVES. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 412-416, 2018.

MOHAMMADI NEJAD, S.; ÖZGÜNEŞ, H.; BAŞARAN, N. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, v. 14, n. 2, p. 201–206, 2017.

MOUMBOCK, Aurélien FA et al. Current computational methods for predicting protein interactions of natural products. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 17, p. 1367-1376, 2019.

MUGHAL, E. U. et al. Flavonols and 4-thioflavonols as potential acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors: Synthesis, structure-activity relationship and molecular docking studies. *Bioorganic chemistry*, v. 91, n. 103124, p. 103124, 2019.

NASCIMENTO, É. C. M.. Determinação teórica de propriedades relevantes para a atividade de inibidor da acetilcolinesterase. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2009.

NASH, K. M.; SCHIEFER, I. T.; SHAH, Z. A. Development of a reactive oxygen species-sensitive nitric oxide synthase inhibitor for the treatment of ischemic stroke. *Free radical biology & medicine*, v. 115, p. 395–404, 2018.

Orbital Eigenvalue Calculations. *J. Phys. Chem. A*, 111, 1554-1561, 2007.  
ORTAR, Giorgio et al. Effect of acyclic monoterpene alcohols and their derivatives on TRP channels. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 24, n. 23, p. 5507-5511, 2014.

OZELA, Priscilla Farias et al. Evaluation of Computational Method from Crystallographic Structure of Galantamine for Molecular Modeling of Drug Candidates Anti-Alzheimer's Disease. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, v. 16, n. 7, p. 2673-2686, 2019.

P FERNANDEZ, A. et al. Nitric oxide: target for therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 25, p. 2837-2850, 2010.

PANG, Xiaocong et al. Evaluation of novel dual acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors as potential anti-Alzheimer's disease agents using pharmacophore, 3D-QSAR, and molecular docking approaches. *Molecules*, v. 22, n. 8, p. 1254, 2017.

PARK, Ji-Young et al. Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 20, n. 19, p. 5928-5935, 2012.

PAUDEL, P.; SEONG, S.H.; ZHOU, Y.; PARK, C.H.; YOKOZAWA, T.; JUNG, HÁ.; CHOI, J.S. Rosmarinic Acid Derivatives' Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Is the Pharmacological Basis of Kangen-Karyu in Alzheimer's Disease. **Molecules : a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry**. V.6,n.1,p. 1420-

3049, Nov. 2018.

PERRY, NS.; HOUGHTON, PJ.; SAMPSON, J.; THEOBALD, AE.; HART, S.; LIS-BALCHIN, M.; HOULT, JR.; EVANS, P.; JENNER, P.; MILLIGAN, S.; PERRY, EK. In-vitro activity of *S.lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. **The Journal of pharmacy and pharmacology**. V.17,n.5, Oct.2001.

POLITZER, Peter; LAURENCE, Patricia R.; JAYASURIYA, Keerthi. Molecular electrostatic potentials: an effective tool for the elucidation of biochemical phenomena. **Environmental health perspectives**, v. 61, p. 191-202, 1985.

Ponzoni, Ignacio et al. "Modelos de classificação QSAR para predição da atividade de inibidores da beta-secretase (BACE1) associada à doença de Alzheimer." Relatórios científicos vol. 9,1 9102. 24 de junho de 2019.

RABBITO, Alessandro et al. Biochemical markers in Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 6, p. 1989, 2020.

Ramachandran, K. I.; Deepa, G.; Namboori, K. *Computational Chemistry and Molecular Modeling: Principles and Applications* (ed.); Springer: Berlin Heidelberg, Germany, 2008.

REDDY, PH.; MANCZAK, M.; YIN, X.; GRADY, MC.; MITCHELL, A.; KANDIMALLA, R.; KURUVA, CS. Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid  $\beta$  induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease. **Journal of investigative medicine**. V.42,n.4. Epub Aug, 2016.

REZAZADEH, M.; HOSSEINZADEH, H.; MORADI, M.; SALEK ESFAHANI, B.; TALEBIAN, S.; PARVIN, S.; GHARESOURAN, J. Genetic discoveries and advances in late-onset Alzheimer's disease. **Journal of cellular physiology**, v.67,n.1, Feb, 2019.

RHEE, I.K.; VAN DE MEENT, M.; INGGANINAN, K.; VERPOORTER. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of chromatography A**. v.915, n.1-2, p.217-223, 2001.

ROBERTS, D. W.; WILLIAMS, D. L.; BETHELL, D. Electrophilic reactions of skin-sensitizing sultones. *Chemical research in toxicology*, v. 20, n. 1, p. 61–71, 2007.

ROEHR S.; PABST A.; LUCK T.; RIEDEL-HELLER, S. G. Secular trends in the incidence of dementia in high-income countries: a protocol of a systematic review and a planned meta-analysis. **BMJ Open**. England, v.4,n.1, Apr, 2017.

SABOGAL-GUÁQUETA, AM.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, GP. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. *Neuropharmacology*. **International journal of neuropharmacology**. V.9, n.1. p. 111-112. Epub: Mar, 2015.

SAMPSON, J.H.; RAMAN, A.; KARLSEN, G.; NAVSARIA, H.; LEIGH, I.M. In vitro keratinocyte antiproliferant effect of Centella asiatica extract and triterpenoid saponins. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v.6,n.1, p.230–235. New York, May.2001.

SANDERSON, D. M.; EARNSHAW, C. G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: The DEREK system. **Human & Experimental Toxicology**, v.10, p. 261-273, 1991.

SANT'ANNA, C.M.R.; Glossário de Termos Usados No Planejamento de Fármacos (Recomendações da IUPAC para 1997). Quím. Nova, 25(3), 505-512.2002.

SANTOS, Cleydson Breno R. et al. A SAR and QSAR study of new artemisinin compounds with antimalarial activity. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 367-399, 2014.  
SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucl.Acids.Res.**, v. 36, p. W223-W228, 2008.

**Schrödinger Release 2020-2** : QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.

SCHÜHLY, Wolfgang et al. Design and synthesis of ten biphenyl-neolignan derivatives and their in vitro inhibitory potency against cyclooxygenase-1/2 activity and 5-lipoxygenase-mediated LTB<sub>4</sub>-formation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 17, n. 13, p. 4459-4465, 2009.

SCHULTZ, T. W. et al. Verification of the structural alerts for Michael acceptors. *Chemical research in toxicology*, v. 20, n. 9, p. 1359–1363, 2007.

SHAHINOZZAMAN, Md et al. Anti-inflammatory, anti-diabetic, and anti-Alzheimer's effects of prenylated flavonoids from Okinawa propolis: an investigation by experimental and computational studies. *Molecules*, v. 23, n. 10, p. 2479, 2018.

SILVERMAN, Richard B. Design of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. *Accounts of chemical research*, v. 42, n. 3, p. 439-451, 2009.

SINGH, Salam Pradeep; KONWAR, Bolin Kumar. Molecular docking studies of quercetin and its analogues against human inducible nitric oxide synthase. *SpringerPlus*, v. 1, n. 1, p. 69, 2012.

SIVAJEYANTHI, Palaniyappan et al. Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and HOMO–LUMO analysis of (E)-N'-(3-hydroxy-4-methoxybenzylidene) nicotinohydrazide monohydrate. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, v. 75, n. 6, p. 804-807, 2019.

SOCHOCKA,M.; ZWOLIŃSKA, K.; LESZEK, J.The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. **Current neuropharmacology**.Sharjah, U.A.E.; San Francisco, CA, v.13,n.1, Oct, 2017.

SPERL, BIANCA; SEIFERT, MARKUS HJ; BERG, THORSTEN. Natural product inhibitors of protein–protein interactions mediated by Src-family SH2 domains. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 19, n. 12, p. 3305-3309, 2009.

STATISTICA, Statsoft Inc. Data analysis software system. **StatSoft Inc**, 2004.  
TANG, Hongjin et al. Effect of *Salvia miltiorrhiza* on acetylcholinesterase: Enzyme kinetics and interaction mechanism merging with molecular docking analysis. **International journal of biological macromolecules**, v. 135, p. 303-313, 2019.

TANVEER, F. et al. Evaluation of anti-EGFR potential of quinazoline derivatives using Molecular docking: An in silico approach. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2021.

TCHANTCHOU, F., LACOR, PN.; CAO, Z.; LAO, L.; HOU, Y.; CUI, C.; KLEIN, WL.; LUO Y. Stimulation of neurogenesis and synaptogenesis by bilobalide and quercetin via common final pathway in hippocampal neurons. **Journal of Alzheimer's disease :JAD**.Netherlands.Vol.14, n.1, 18(4):787-98. Feb. 2009.

TEWARI, D.; STANKIEWICZ, AM; MOCAN, A.; SAH, NA.; TZVETKOV, NT.; HUMINIECKI, L.; HORBAŃCZUK, JO.; ATANASOV, AG. Ethnopharmacological Approaches for Dementia Therapy and Significance of Natural Products and Herbal Drugs. Switzerland, **Lausanne: Frontiers Research Foundation**, v1, Feb, 2018.

THOMPSON, D. C.; PERERA, K.; LONDON, R. Quinone methide formation from para isomers of methylphenol (cresol), ethylphenol, and isopropylphenol: relationship to toxicity. *Chemical research in toxicology*, v. 8, n. 1, p. 55–60, 1995.

VALLIANATOU, Theodosia; LAMBRINIDIS, George; TSANTILI-KAKOULIDOU, Anna. In silico prediction of human serum albumin binding for drug leads. *Expert opinion on drug discovery*, v. 8, n. 5, p. 583-595, 2013.

VERDONK, Marcel L. et al. Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.

VIRTUAL COMPUTATIONAL LABORATORY, VCCLAB, **2005**, <<http://www.vcclab.org>>.

VISUALIZER, Discovery Studio. Dassault Systèmes BIOVIA. **San Diego, nd**, 2020.

VOLPE, Donna A. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future medicinal chemistry*, v. 3, n. 16, p. 2063-2077, 2011.

WANG M, LI Y, NI C, SONG G. Honokiol Attenuates Oligomeric Amyloid $\beta$ 1-42-Induced Alzheimer's Disease in Mice Through Attenuating Mitochondrial Apoptosis and Inhibiting the Nuclear Factor Kappa-B Signaling Pathway. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**. New York. V.8, n. 1, 43(1):69-81. Epub, Aug, 2017.

WANG, Jinan et al. Weak-binding molecules are not drugs?—toward a systematic strategy for finding effective weak-binding drugs. **Briefings in bioinformatics**, v. 18, n. 2, p. 321-332, 2017.

WANG, Q. et al. Methamphetamine induces hepatotoxicity via inhibiting cell division, arresting cell cycle and activating apoptosis: In vivo and in vitro studies. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 105, p. 61–72, 2017.

WANG, S. et al. Primary aromatic amines and cancer: Novel mechanistic insights using 4-aminobiphenyl as a model carcinogen. *Pharmacology & therapeutics*, v. 200, p. 179–189, 2019.

WILKINS, David M. et al. Accurate molecular polarizabilities with coupled cluster theory and machine learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 9, p. 3401-3406, 2019.

WONG, Kelvin Kin-Kwan et al. Interaction study of two diterpenes, cryptotanshinone and dihydrotanshinone, to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by molecular docking and kinetic analysis. *Chemico-biological interactions*, v. 187, n. 1-3, p. 335-339, 2010.

XIE, H.; WANG, J.R.; YAU, L.F.; LIU, Y.; LIU, L.; HAN, Q.B.; ZHAO, Z.; JIANG, ZH. Quantitative analysis of the flavonoid glycosides and terpene trilactones in the extract of Ginkgo biloba and evaluation of their inhibitory activity towards fibril formation of  $\beta$ -amyloid peptide. **Molecules**.V.6, p.1433-1373.Apr ,2014.

XU, Guanhong et al. The discovery of potentially selective human neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitors: A combination of pharmacophore modelling, CoMFA, virtual screening and molecular docking studies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 5, p. 8553-8569, 2014.

XU, Y.; CHENG, S.; SUSSMAN, J. L.; SILMAN, I.; JIANG, H. Computational Studies on Acetylcholinesterases. **Molecules**. **Molecules : a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry**. v.6,n.1, August, 2017.

YUAN, C. et al. Removal of hERG potassium channel affinity through introduction of an oxygen atom: Molecular insights from structure-activity relationships of strychnine and its analogs. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 360, p. 109–119, 2018.

ZHANG, Gang; MUSGRAVE, Charles B. Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations. **The journal of physical chemistry A**, v. 111, n. 8, p. 1554-1561, 2007.

ZHANG, Lihu et al. Identification of human acetylcholinesterase inhibitors from the constituents of EGb761 by modeling docking and molecular dynamics simulations. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 21, n. 1, p. 41-49, 2018.

ZHANG, R.; LI, J.; CUI, X. Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2,6-di-tert-butyl-hydroxytoluene in mice. The Science of the total environment, v. 739, n. 139862, p. 139862, 2020.

ZHANG, XZ.; QIAN, SS.; ZHANG, YJ.; WANG, RQ. Salvia miltiorrhiza: A source for anti-Alzheimer's disease drugs. **Pharmaceutical biology**. London, p.18-24. Epub 2015 Apr 10.

ZHANG, Z.; LI, X.; LI, D.; LUO, M.; LI, Y.; SONG, L.; JIANG, X. Asiaticoside ameliorates  $\beta$ -amyloid-induced learning and memory deficits in rats by inhibiting mitochondrial apoptosis and reducing inflammatory factors. **Experimental and therapeutic medicine**. Greece. Athens : Spandidos, Vol. 1, n. 4, p. 413-420, (July/Aug. 2010), Pub. Feb, 2017.

### **ANEXO 1 – Normas de publicação dos respectivos periódicos**

#### **MANUSCRIPT PREPARATION**

The manuscript should be written in English in a clear, direct and active style. All pages must be numbered sequentially, facilitating in the reviewing and editing of the manuscript.

#### **MICROSOFT WORD TEMPLATE**

It is advisable that authors prepare their manuscript using the template available on the Web, which will assist in preparation of the manuscript according to Journal's Format. [Download the Template](#).

#### **SECTIONS IN MANUSCRIPTS**

Manuscripts submitted for research and review articles in the journal should be divided into the following sections:

- Title
- Title page
- Structured Abstract
- Graphical Abstract
- Keywords
- Text Organization
- Conclusion
- List of Abbreviations (if any)
- Consent for Publication
- Conflict of Interest
- Acknowledgements
- References
- Appendices
- Figures/Illustrations (if any)
- Chemical Structures (if any)
- Tables (if any)

- Supportive/Supplementary Material (if any)

## **Title**

The title of the article should be precise and brief and must not be more than 120 characters. Authors should avoid the use of non-standard abbreviations and question marks in titles. The first letter of each word should be in capital letters except for articles, conjunctions and prepositions.

As recommended by the Reporting guidelines information about the study should be a part of the title (particularly for systematic reviews and meta analyses).

Authors should also provide a 'running title'. Title, running title, byline, correspondent footnote and key words should be written as presented in original manuscripts.

## **Title Page**

Title page should include paper title, author(s) full name and affiliation, corresponding author(s) names complete affiliation/address, along with phone, fax and email.

## **Structured Abstract**

The abstract of an article should be its clear, concise and accurate summary, having no more than 250 words, and including the explicit sub-headings (as in-line or run-in headings in bold). Use of abbreviations should be avoided and the references should not be cited in the abstract.

All the original research articles, systematic reviews and meta analyses must be accompanied with a structured abstract. Ideally, each abstract should include the following sub-headings, but these may vary according to requirements of the article.

- Background
- Objective
- Methods
- Results
- Conclusion

The headings can vary, but must state the purpose of the study, details of the participants, measurements, methods, main findings and conclusion.

## **Graphical Abstract**

A graphic must be included with each manuscript for use in the Table of Contents (TOC). This must be submitted separately as an electronic file (preferred file types are EPS, PDF, TIFF, Microsoft Word, PowerPoint and CDX etc.). A graphical abstract, not exceeding 30 words along with the illustration, helps to summarize the contents of the

manuscript in a concise pictorial form. It is meant as an aid for the rapid viewing of the journals' contents and to help capture the readers' attention. The graphical abstract may feature a key structure, reaction, equation, etc. that the manuscript elucidates upon. It will be listed along with the manuscript title, authors' names and affiliations in the contents page, typeset within an area of 5 cm by 17 cm, but it will not appear in the article PDF file or in print.

Graphical Abstracts should be submitted as a separate file (must clearly mention graphical abstract within the file) online via Bentham's Manuscript Processing System.

### **Keywords**

6 to 8 keywords must be provided. Choose important and relevant keywords that researchers in your field will be searching for so that your paper will appear in a database search. The keywords should be contained in the title and they should appear several times in the article. In biomedical fields, MeSH terms are a good 'common vocabulary' source to draw keywords from <https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>.

### **Text Organization**

The main text should begin on a separate page and should be divided into title page, abstract and the main text. The text may be subdivided further according to the areas to be discussed, which should be followed by the Acknowledgement (if any) and Reference sections. The Review Article should mention any previous important old and recent reviews in the field and contain a comprehensive discussion starting with the general background of the field. It should then go on to discuss the salient features of recent developments. The authors should avoid presenting material which has already been published in a previous review. The authors are advised to present and discuss their observations in brief.

For Research Articles, the manuscript should begin with the title page and abstract followed by the main text, which must be structured into separate sections as **Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Ethics Approval and Consent to Participate, Human and Animal Rights, Conflict of Interest, Acknowledgements and References.**

The manuscript style must be uniform throughout the text and 10 pt Times New Roman font should be used. The full term for an abbreviation should precede its first appearance in the text unless it is a standard unit of measurement. The reference

numbers should be given in square brackets in the text. Italics should be used for Binomial names of organisms (Genus and Species), for emphasis and for unfamiliar words or phrases. Non-assimilated words from Latin or other languages should also be italicized e.g. *per se*, *et al.* etc.

## **SECTION HEADINGS**

Section headings should be numbered sequentially, left aligned and have the first letter capitalized, starting with the introduction. Sub-section headings however, should be in lower-case and italicized with their initials capitalized. They should be numbered as 1.1, 1.2, etc.

## **INTRODUCTION**

The Introduction section should include the background and aims of the research in a comprehensive manner.

## **MATERIALS AND METHODS**

This section provides details of the methodology used along with information on any previous efforts with corresponding references. Any details for further modifications and research should be included. Sufficient details should be provided to the reader about the original data source in order to enable the analysis, appropriateness and verification of the results reported in the study.

It is important for the Method Section should be sufficiently detailed in respect of the data presented, and the results produced from it. This section should include all the information and protocol gathered for the study at the time when it was being written. If the study is funded or financially supported by an organization to conduct the research, then it should be mentioned in the Method Section. Methods must be result-oriented. The statement regarding the approval by an independent local, regional or national review committee (e.g. name of ethic committee and institutional review board) should be part of the Methods Section.

## **EXPERIMENTAL**

Repeated information should not be reported in the text of an article. A calculation section must include experimental data, facts and practical development from a theoretical perspective.

### **Experimental Validation**

The authors are required to submit supportive material of research papers submitted to Current Computer Aided Drug Design, in which in silico models are validated through

relevant experimental data either from the author's own lab or through citation of a suitable experimental data available in the published literature.

For QSAR studies, when the number of cases or data points ( $n$ ) is smaller than the number of predictors ( $p$ ), ordinary least square (OLS) is not the right statistical method; robust methods like principal component analysis (PCA), partial least square (PLS), ridge regression (RR) must be used. The authors should also carry out two-deep cross validation to obtain the correct (true)  $q^2$ , not naïve (wrong)  $q^2$ .

## **RESULTS**

Results should be precise.

## **DISCUSSION**

This should explore the significance of the results of the work, present a reproducible procedure and emphasize the importance of the article in the light of recent developments in the field. Extensive citations and discussion of published literature should be avoided.

The Results and Discussion may be presented together under one heading of "Results and Discussion". Alternatively, they may be presented under two separate sections ("Results" section and "Discussion" Sections). Short sub-headings may be added in each section if required.

## **CONCLUSION**

A small paragraph summarizing the contents of the article, presenting the final outcome of the research or proposing further study on the subject, may be given at the end of the article under the Conclusion section.

## **FUNDING**

The authors need to declare the funding sources of their manuscripts clearly by providing the name of the funding agency or financial support along with allotted grant/award number in round brackets (if applied), for instance, "This work was financially supported by [Name of the funding agency] (Grant number XXX).

Similarly, if a paper does not have any specific funding source, and is part of the employment of the authors, then the name of the employer will be required. Authors will have to clearly state that the funder was involved in writing, editing, approval, or decision to publish the article.

## **Greek Symbols and Special Characters**

Greek symbols and special characters often undergo formatting changes and get corrupted or lost during preparation of manuscript for publication. To ensure that all special characters used are embedded in the text, these special characters should be inserted as a symbol but should not be a result of any format styling (*Symbol* font face) otherwise they will be lost during conversion to PDF/XML.

Authors are encouraged to consult reporting guidelines. These guidelines provide a set of recommendations comprising a list of items relevant to their specific research design. Chemical equations, chemical names, mathematical usage, unit of measurements, chemical and physical quantity & units must conform to SI and Chemical Abstracts or IUPAC.

All kinds of measurements should be reported only in International System of Units (SI).

### **Appendices**

In case there is a need to present lengthy, but essential methodological details, appendices must be used, which can be a part of the article. An appendix must not exceed three pages (Times New Roman, 10 point fonts, 900 max. words per page). The information should be provided in a condensed form, ruling out the need of full sentences. A single appendix should be titled APPENDIX, while more than one can be titled APPENDIX A, APPENDIX B, and so on.

### **Supportive/Supplementary Material (if any)**

We do encourage to append supportive material, for example a PowerPoint file containing a talk about the study, a PowerPoint file containing additional screenshots, a Word, RTF, or PDF document showing the original instrument(s) used, a video, or the original data (SAS/SPSS files, Excel files, Access Db files etc.) provided it is inevitable or endorsed by the journal's Editor.

Supportive/Supplementary material intended for publication must be numbered and referred to in the manuscript but should not be a part of the submitted paper. In-text citations as well as a section with the heading "Supportive/Supplementary Material" before the "References" section should be provided. Here, list all Supportive/Supplementary Material and include a brief caption line for each file describing its contents.

Any additional files will be linked to the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the paper. They will be made available in

exactly the same form as originally provided only on our Web site. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet). Supportive/ Supplementary material must be provided in a single zipped file not larger than 4 MB.

Authors must clearly indicate if these files are not for publication but meant for the reviewers'/editors' perusal only.

### **List of Abbreviations**

If abbreviations are used in the text either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided.