



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

BIANCA LIFFEY BRITO MARINO

**Planejamento de protótipos candidatos a fármacos para o
tratamento da Doença de Parkinson: avaliação *in silico* e *in vivo***

**Macapá
2020**

BIANCA LIFFEY BRITO MARINO

**Planejamento de protótipos candidatos a fármacos para o
tratamento da doença de parkinson: avaliação *in silico* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr^a. Prof^a Lorane Izabel da Silva Hage Melim

**Macapá
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Marino, Bianca Liffey Brito.

Planejamento de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Parkinson: avaliação *in silico* e *in vivo*. / Bianca Liffey Brito Marino; orientadora, Lorane Izabel da Silva Hage Melim. – Macapá, 2020.
69 f.

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

1. Produtos naturais. 2. Doença de Parkinson. 3. Zebrafish. I. Melim, Lorane Izabel da Silva Hage, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

616.833 M339p
CDD. 22 ed.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Bianca Liffey Brito Marino

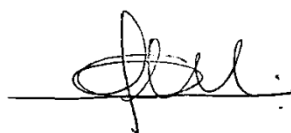
Orientador(a): Lorane Izabel da Silva Hage Melim

Co-Orientador(a):



Prof^a. Dr^a Lorane Izabel da Silva Hage-Melim

Professora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Prof^o. Dr^o. Irlon Marciel Ferreira

Professor do Curso de Química da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Prof^o. Dr^o Josivan da Silva Costa

Professor do Curso de Química da Universidade Estadual do Amapá, UEAP.

Data: 22/03/2021

Dedico este trabalho a Deus, minha orientadora, meus pais e as pessoas diagnosticadas com Parkinson.

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado sabedoria para as escolhas que fiz e que me levaram a esse trabalho, além da saúde e de todos que pôs em minha vida para ajudar nessas escolhas.

Aos meus pais pela paciência e incentivos para que eu não desistisse, por terem sido meus alicerces quando tudo parecia desabar e não medirem esforços para que eu pudesse levar os estudos adiante.

À esta instituição pelo fornecimento de estrutura física, e aos professores parceiros que além de permitiram realizar essa pesquisa nos laboratórios aos quais são responsáveis, também me orientaram para desenvolver o trabalho da melhor forma possível.

À minha querida orientadora Lorane Izabel da Silva Hage Melim, carinhosamente chamada de mãe, que pacientemente e incansavelmente me repassou os ensinamentos da academia e da vida para que eu realizasse esse trabalho. E ao digníssimo professor e colega de laboratório Jaderson Vieira Ferreira que me ajudou nas etapas dos estudos e aconselhou quanto aos empecilhos do mestrado.

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3	ARTIGO 1.....	31
3.1	Química Medicinal, síntese, avaliação de atividade biológica antiparkinsoniana de chalconas planejadas.....	31
	Introdução.....	31
	Resultado e discussão.....	32
	Pesquisa bibliográfica de substâncias naturais.....	32
	Derivação do padrão farmacofórico.....	33
	Estudo de <i>docking</i> molecular.....	34
	Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) e toxicológicas.....	39
	<i>Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME).....</i>	<i>39</i>
	<i>Predição das propriedades toxicológicas.....</i>	<i>41</i>
	Modificações estruturais, predição de atividade e viabilidade sintética.....	42
	<i>Modificações estruturais.....</i>	<i>42</i>
	<i>Predição de atividade.....</i>	<i>43</i>
	<i>Viabilidade sintética.....</i>	<i>45</i>
	Rota sintética.....	45
	Atividade farmacológica em modelo zebrafish.....	46
	Sujeitos e procedimento de criação.....	46
	Ensaio de toxicidade da substância estudada.....	46

Conclusão.....	46
Sessão experimental.....	47
Busca pelas estruturas das substâncias naturais.....	47
Derivação do padrão farmacofórico	47
Estudo de <i>docking</i> molecular.....	47
Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) e toxicológicas.....	47
<i>Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME)</i>	47
<i>Predição das Propriedades toxicológicas</i>	47
Modificações estruturais, predição de atividade e viabilidade sintética.....	48
Rota sintética.....	48
Atividade farmacológica em modelo zebrafish.....	48
Sujeitos e procedimento de criação.....	48
Teste de toxicidade aguda.....	48
Considerações éticas.....	49
Referências.....	49
Material suplementar.....	51
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	60
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética.....	62
Anexo 2 – Normas de publicação dos respectivos periódicos.....	63

LISTA DE TABELAS, FIGURAS, ANEXOS E APÊNDICES

Lista de Tabelas

Tabela 1	Simulação de <i>docking</i> entre as moléculas estudadas e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima MAO-B.....	45
Tabela 2	Propriedades farmacocinéticas da Selegilina (1) e das substâncias naturais: Amburosideo A (2), Harman (3), Harmalina (4) e Harmalol (5).....	46
Tabela 3	Propriedades toxicológicas da Selegilina (1) e das substâncias naturais: Amburosideo A (2), Harmalina (3), Harmam (4), Harmalol (5)..	46
Tabela 4	Predição de atividade biológica com o webserver PASS para as moléculas planejadas PMC1, PMC2, PMC3.....	53
Tabela 5	Predição de atividade biológica com o webserver PASS para as moléculas planejadas PMC1, PMC2, PMC3.....	54

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura química da Selegilina (1), e das substâncias naturais Amburosideo A (2), Harman (3), Harmalina (4), Harmalol (5).....	37
Figura 2	Derivação do grupamento farmacofórico da Selegilina e as 4 substâncias naturais.....	39
Figura 3	Resultado da simulação de <i>docking</i> com o menor RMSD para a validação do complexo 4A79.....	40
Figura 4	Representação da simulação de <i>docking</i> molecular dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo da MAO-B e as substâncias naturais estudadas: Selegilina (1), Amburosideo A (2), Harman (3), Harmalina (4) e Harmalol (5).....	40

Figura 5	Substância natural Amburosídeo A (1) e os três análogos intitulados PMC1 (2), PMC2 (3), PMC (4).....	50
-----------------	---	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
AOH	Absorção Oral Humana
BIORG	Laboratório de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
COMT	Catecol o-metiltransferase
DA	Dopamina
Derek	Webservidor para predição das propriedades toxicológicas
DP	Doença de Parkinson
HCl	Ácido clorídrico
IMAO	Inibidores da enzima monoamina oxidase B
L-DOPA	Ácido (S)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil propanoico)
LogP	Coeficiente de Lipofilicidade
LPP	Ligação nas Proteínas Plasmáticas
MAO-B	Monoamina oxidase B
pMDCK	Maden Darby Canine Kidney (células de rins canino)
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NaOH	Hidróxido de sódio
PASS	Webservidor para predição de atividade biológica
pBHE	Penetração na Barreira Hematoencefálica
pCaco-2	Permeabilidade das células de Adenocarcinoma de Cólon humano
Qikprop	Webservidor para predição das propriedades farmacocinéticas

SEA	Webservidor para predição de atividade biológica
Sylvia	Webservidor para predição da viabilidade sintética

PLANEJAMENTO DE PROTÓTIPOS CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON: AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO*

RESUMO

Introdução: A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa que acomete a sociedade, principalmente em indivíduos acima de 60 anos, sendo a sua fisiopatologia caracterizada pela morte dos neurônios dopaminérgicos diminuindo assim a produção do neurotransmissor dopamina que está relacionado com as áreas motoras e cognitivas. Uma das formas de tratamento da DP é a inibição da monoamina oxidase B (MAO-B) por ser uma das enzimas que degradam a dopamina, em que estudos recentes identificaram substâncias de origem natural com essa atividade. Através do estudo *in silico*, utilizando webserveres e softwares, é possível realizar triagem virtual e prever as características farmacocinéticas e toxicológica, atividade biológica para assim encontrar um candidato a fármaco com ação desejada. No estudo *in vivo* têm-se utilizado desde a década de 80 o modelo animal *Danio rerio* (Zebrafish), devido a estrutura cerebral do sistema dopaminérgico ter mais de 80% de compatibilidade com o ser humano. **Objetivo:** Assim, o objetivo do estudo foi planejar moléculas, por meio de metodologias *in silico*, com atividade inibitória da MAO-B, baseando-se em produtos naturais, realizar a síntese e testá-las *in vivo*. **Metodologia:** Foi realizada uma pesquisa na literatura para identificar substâncias de origem natural com ação antiparkinsonianas comprovadas *in vitro* e/ou *in vivo*. Posteriormente, *in silico*, realizou-se a derivação do farmacóforo, *docking* molecular, predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, modificações estruturais para obtenção dos análogos, predição de atividade e viabilidade sintética. Após obter os análogos foi realizada a síntese. E por fim, para o estudo *in vivo*, foi realizado o teste de toxicidade aguda em modelo animal Zebrafish. **Resultados e discussões:** Na busca da literatura foram selecionadas quatro substâncias de origem natural sendo Amburosídeo A, Harman, Harmalina, Harmalol e o medicamento Selegilina que foi utilizado como molécula padrão para comparação no estudo *in silico*. Na derivação do farmacóforo obteve-se alinhamento entre Selegilina e Harmalina identificando uma região aromática, uma região aceitadora de hidrogênio e uma região hidrofóbica, em que supõe-se serem as regiões essenciais para a atividade inibitória da MAO-B. Para as análises farmacocinéticas, as substâncias apresentaram resultados entre ruins e moderados tanto para absorção quanto para distribuição obtendo somente a molécula Harman com todos os resultados satisfatórios, enquanto que para a predição de propriedades toxicológicas apresentaram entre baixa ou nenhuma toxicidade. No *docking*, molecular todas as substâncias interagiram com mais de três aminoácidos do sítio ativo da MAO-B e também interagiram com alguns aminoácidos que a Selegilina (molécula padrão) interagiu, indicando que possuem interação com a enzima e sugerindo a provável atividade inibitória. Após as análises, foi selecionado o Amburosídeo A, como protótipo para as modificações e, então, 3 análogos (PMC1, PMC2 e PMC3) foram obtidos com resultado entre média e boa viabilidade sintética e todos os três apresentaram predição de atividade de inibição da MAO. Posteriormente, os protótipos foram sintetizados, e devido a PMC3 ter apresentado possível ação tanto na enzima MAO-B quanto na COMT foi selecionada para o ensaio de toxicidade aguda *in vivo* em modelo Zebrafish. **Considerações finais e perspectivas:** Todos os análogos planejados apresentaram possível atividade inibitória da MAO-B, em que especificamente o análogo PMC3 apresentou ação também para COMT, *in silico*, sugerindo uma ação multialvo, além de sua característica de fácil síntese, e também por não manifestaram toxicidade em Zebrafish, pode-se indicar que este análogo é um promissor candidato a fármaco multialvo para o tratamento da Doença de Parkinson.

Palavras-Chave: Produtos naturais, Parkinson, Zebrafish.

DESIGN OF DRUG CANDIDATES FOR THE TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE: EVALUATION *in silico* AND *in vivo*

Abstract

Introduction: Parkinson's disease (PD) is the second neurodegenerative disease that affects society, especially in individuals over 60 years of age, and its pathophysiology is characterized by the death of dopaminergic neurons, thus decreasing that of the neurotransmitter dopamine that is related to the areas motor and cognitive. One of the forms of treatment of PD is the inhibition of monoamine oxidase B (MAO-B) because it is one of the enzymes that degrade dopamine, in which recent studies have identified substances of natural origin with this activity. Through the *in silico* study, using web servers and software, it is possible to perform virtual screening and predict pharmacokinetic and toxicological characteristics, biological activity to find a drug candidate with the desired action. In the *in vivo* study, the animal model *Danio rerio* (zebrafish) has been used since the 1980s, due to a brain structure of the dopaminergic system having more than 80% compatibility with humans. **Objective:** Thus, the objective of the study was to design molecules, using *in silico* methodologies, with MAO-B inhibitory activity, based on natural products, perform the synthesis and them *in vivo* test. **Methodology:** A literature search was conducted to identify substances of natural origin with antiparkinsonian action proven *in vitro* and/or *in vivo*. Subsequently, *in silico*, derivation of the pharmacophore, molecular docking, prediction of pharmacokinetic and toxicological properties, modifications made to obtain the analogs, prediction of activity and synthetic viability. After obtaining the analogs, the synthesis was performed. Finally, for the *in vivo* study, an acute toxicity test was performed on an animal model of zebrafish. **Results and discussion:** In the literature search, four formations of natural origin were selected, Amburoside A, Harman, Harmalina, Harmalol and the drug Selegiline, which was used as a standard molecule for comparison without in silico study. In the derivation of the pharmacophore, an alignment between Selegiline and Harmalin is identified, identifying an aromatic region, a hydrogen accepting region and a hydrophobic region, in which it is assumed that the regions are essential for MAO-B inhibitory activity. For pharmacokinetic analyzes, dissipation results between ruins and moderates for both absorption and distribution obtaining only one Harman molecule with all satisfactory results, while for the prediction of secondary toxicological properties between low or no toxicity. In docking studies, all molecular substances interacted with more than three amino acids from the MAO-B active site and also interacted with some amino acids that Selegiline (standard molecule) interacted with, indicating that they have interaction with the enzyme and suggesting a likely inhibitory activity. After the analysis, Amburoside A was selected as the prototype for the modifications and then 3 analogs (PMC1, PMC2 and PMC3) were used with the result between average and good synthetic viability and all three odd MAO inhibition activities. Subsequently, the prototypes were synthesized, and because PMC3 showed possible action on both the MAO-B enzyme and COMT, it was provided for the acute toxicity *in vivo* test in the Zebrafish model. **Final considerations and perspectives:** All possible analogs designed for MAO-B inhibitory activity, in which the PMC3 analog specifically presents action also for COMT, *in silico*, suggesting a multi-target action, in addition to its characteristic of easy synthesis, and also for not manifesting toxicity in zebrafish, it can be indicated that this analog is a promising candidate for a multi-target drug for the treatment of Parkinson's disease.

Keywords: Natural products, Parkinson's, Zebrafish.

REVIEW ARTICLE



Parkinson's Disease: A Review from Pathophysiology to Treatment



Bianca L.B. Marino¹, Lucilene R. de Souza¹, Kessia P.A. Sousa¹, Jaderson V. Ferreira¹, Elias C. Padilha², Carlos H.T.P. da Silva^{3,4}, Carlton A. Taft⁵ and Lorane I.S. Hage-Melim^{1,*}

¹Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (PharMedChem), Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brazil; ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Araraquara, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Araraquara, São Paulo, Brazil; ³Laboratório Computacional de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ⁴Department of Chemistry, School of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto (Brazil); ⁵Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: December 13, 2018
Revised: April 02, 2019
Accepted: September 02, 2019

DOI:
10.2174/1389557519666191104110908



Abstract: Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in the elderly population, with a higher prevalence in men, independent of race and social class; it affects approximately 1.5 to 2.0% of the elderly population over 60 years and 4% for those over 80 years of age. PD is caused by the necrosis of dopaminergic neurons in the substantia nigra, which is the brain region responsible for the synthesis of the neurotransmitter dopamine (DA), resulting in its decrease in the synaptic cleft. The monoamine oxidase B (MAO-B) degrades dopamine, promoting the glutamate accumulation and oxidative stress with the release of free radicals, causing excitotoxicity. The PD symptoms are progressive physical limitations such as rigidity, bradykinesia, tremor, postural instability and disability in functional performance. Considering that there are no laboratory tests, biomarkers or imaging studies to confirm the disease, the diagnosis of PD is made by analyzing the motor features. There is no cure for PD, and the pharmacological treatment consists of a dopaminergic supplement with levodopa, COMT inhibitors, anticholinergics agents, dopaminergic agonists, and inhibitors of MAO-B, which basically aims to control the symptoms, enabling better functional mobility and increasing life expectancy of the treated PD patients. Due to the importance and increasing prevalence of PD in the world, this study reviews information on the pathophysiology, symptomatology as well as the most current and relevant treatments of PD patients.

Keywords: Parkinson's disease, neuronal degeneration, dopamine, dopaminergic agonists, pharmacological treatment, pathophysiology, symptomatology.

1. INTRODUCTION

In neurology, neurodegenerative diseases are defined by the progressive and irreversible loss of neurons located in specific brain regions. Studies have shown that aging is mainly responsible for these disorders, with three scientifically proven factors: damage to the nuclear DNA of neurons, increased oxidative stress and chronic neuroinflammation [1, 2]. Parkinson's Disease (PD), first described by James Parkinson in 1817, is a neurodegenerative disease caused by necrosis of dopaminergic neurons located in the substantia nigra, a brain region responsible for the synthesis of the neurotransmitter dopamine (DA) [4-(2-aminoethyl) benzene-1,2-diol] [3, 4].

PD is the second most common neurodegenerative disease in the elderly, affecting men and women without differentiation between race or social class. Approximately 1.5 to 2.0% of the elderly population (over 60 years) and 4% over 80 years are affected [5]. With longer life expectancy, given the growth of the population over 65 years of age, it is estimated that a population of about 200,000 individuals with PD exists in Brazil. The prevalence in older persons aged 60 to 69 years is 700/100,000, and those aged 70 to 79 years is 1,500/100,000. In addition, 36,000 new cases are diagnosed each year in Europe [5].

The prevalence of PD in industrialized countries is estimated as 0 to 3% of the population and about 1% of the population over 60 years of age. Some studies have reported a higher prevalence of PD in men over women, and the standardized incidence ratio was diagnosed as 8-18 per 100,000

*Address correspondence to this author at the Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (PharMedChem), Universidade Federal do Amapá, Macapá, Brazil; E-mails: lorane@unifap.br; and loranehage@gmail.com

people/year with PD. Studies have found that particular metabolic diseases are associated with neurodegenerative diseases such as PD, and the development of such metabolic diseases increases for the elderly population over 60 years of age [6, 7].

The PD patient also presents dementia in 65% of cases whereas studies indicate that dementia has a cumulative prevalence of up to 78% in the following 8 years after the development of PD [8]. With advancing age there is also the likelihood that the PD incidence in the world population reaches 1,903 per 100,000 people for those over 80 years of age. In many developed countries, at least 50% of babies born will live to 100 years of age. In Japan, for example, it is expected that 50% of the babies born in 2007 will live to the age of 107 years. As the incidence of PD increases with age, more patients can be expected to develop PD. Asia will experience the full impact of the increase in the PD population as it represents about 60% of the world's population *i.e.* more than 4 billion people [9, 10]. The studies by Lau and Breteler describe a large prevalence of PD cases compared to the size of the population [11-13].

The estimate of the population with PD will be 9.3 million in 2030 whereas for the six most populous countries in Asia (China, India, Indonesia, Pakistan, Bangladesh and Japan) there will be 6.17 million people with PD [10]. In the United States, about 630,000 were diagnosed with PD in 2010, and the estimate for 2040 is that this population will double [9]. In Japan, approximately 141,000 persons have been reported to have PD, with an estimated population of 127.3 million people [12, 13]. In Brazil, PD has an estimated prevalence of 3.3% whereas, according to the IBGE, the quality of life of the Brazilian population increased by 21% for the population over 65 years age, with an estimated population of about 200 thousand patients with PD [14-16].

2. PATHOPHYSIOLOGY

PD is a progressive, neurodegenerative disorder characterized by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. In addition to the cardinal motor symptoms, such as tremor, rigidity and bradykinesia, PD patients also suffer from a variety of non-motor symptoms, including anxiety, depression and dementia, in which the serotonergic system playing a pivotal role is increasingly recognized [3, 4, 17]. Lack of DA affects motor and cognitive functions related to language, since the carrier with an advanced level of the disease loses the ability to speak correctly [18].

Many other regions of the brain are important in PD. Braak *et al.* [19] demonstrated Lewy Body Pathology (LBP) in many extranigral regions and proposed that this pathology progresses through the brainstem beginning in the dorsal vagal nucleus of the motor and reaching the entire neocortex. It is important to note that many of these affected regions are closely related to non-motor symptoms associated with PD and some regions also show signs of neurodegeneration [19, 20].

Today, with better understanding of neuroinflammatory mechanisms, hypotheses emerged to explain the degeneration

of these neurons. There is excitotoxicity with glutamate accumulation in the dopaminergic neurons region; the oxidative stress caused by monoamine oxidase B (MAO-B) occurs when the enzyme degrades dopamine and releases free radicals or Reactive Oxygen Species (ROS). Other mechanisms involve nitric oxide and mitochondrial dysfunction which are involved in the pathophysiology of the disease as well as the dual-hit hypothesis [21-23].

The dual-hit theory consists of the hypothesis that a pathogen enters the airway and/or gastrointestinal system to the CNS and thus causes PD. According to this theory, a pathogen swallowed with nasal secretions and saliva can cross the mucosal barrier of the gastrointestinal tract, infect the enteric neurons and invade parasympathetic motor neurons of the vagus nerve. The nervous systems of both the olfactory and enteric bulbs do not have a barrier to select substances such as the CNS whereas some studies have confirmed the relationship of HSV-1 virus to the development of PD through autoimmune mechanisms. An induction of α -synuclein protein occurs and thus aggregation of proteins from axonal projections of the gastrointestinal plexus to pre-ganglionic parasympathetic motor neurons of the vagus nerve in the brainstem occurs. From the motor neurons of the vagus nerve, the pathogens can travel retrograde to the bone marrow, then to the bridge, and finally to the substantia nigra, to produce the classic motor symptoms of PD [24, 25]. This hypothesis confirms the first stage of PD described by Braak *et al.* [19, 26].

One of the forms used to better understand the physical consequences of PD is the Braaks definition which reports six stages of the pathological process that is directly related to pathology [27]:

- Stage 1 - Related degeneration of the olfactory bulb causing disturbances in smell.
- Stage 2 - Progression down the brainstem, with non-motor symptoms, homeostasis, sleep-wake cycle and autonomic nervous system.
- Stage 3 and 4 - Commitment of the substantia nigra and other deep nuclei, characterized as the classic tetrad of the disease, it marks the clinical diagnosis of the syndrome.
- Stage 5 and 6 - Presence of Lewy bodies in limbic structures and in the neocortex, the presence of neuropsychiatric symptoms such as depression, cognitive decline and visual hallucinations.

2.1. Excitotoxicity

According to some studies, excitotoxicity is related to an inflammatory process triggered in the CNS. The onset of the inflammatory process is not sufficiently clarified, but there is evidence of the activation of the microglia cells by neurotoxic agents that consequently initiate the inflammatory process with the excessive presence of cytokines and antibodies. Glutamate is a neurotransmitter in the CNS, which in excess, can trigger excitotoxicity. With the death of the dopaminergic neurons, there is a decrease in dopaminergic neurotrans-

mission and consequently a superactivation of the subthalamic nucleus causing an increase in the release of glutamate in the substantia nigra. Since this region is rich in AMPA and NMDA receptors, there is depolarization and excitation of the neurons, resulting in neural death due to membrane deregulation [28, 29].

2.2. Oxidative Stress

With the advance of the disease and the degeneration of neurons, Lewy bodies are formed. They are cytoplasmic substances which characterize a clinically defined syndrome that consists of a primary form of dementia. Lewy bodies dementia is characterized by visual-perceptive changes and motor dysfunction associated with dysregulation of the alpha-synuclein protein which starts an inflammation state in the Peripheral Nervous System (PNS) and further reaches the Central Nervous System (CNS) through trans-synaptic neurons from the nasal or gastric routes [30].

When ROS are generated, they can react with any constitutive molecules, proteins, DNA or cells causing changes in their functions and therefore repair mechanisms are released. The attempt to repair starts an inflammatory process in the substantia nigra region of the midbrain, creating agglomerates. Examples of ROS are the toxic form MPP⁺ originated from MPTP conversion which is degraded by MAO-B enzyme [16, 31]. Such clusters, in turn, lead to other mechanisms such as cells loss at the pedunculopontine nucleus caused by its inhibition, allowing the reticulospinal and vestibulospinal routes to produce excessive muscle contraction [16, 32]. Many authors have focused on research for novel inhibitors of MAO B enzyme [33, 34].

For the development of PD, ROS also affect nucleic acid stability by oxidizing RNA, causing mutation in mitochondrial DNA, together with the oxidation of alpha-synuclein, parkin and proteasome proteins in the CNS, resulting in increased aggregation of these proteins and triggering an inflammatory process. Homeostasis is interrupted due to activation of the potassium channels and the inactivation of the neural nicotinic receptors, affecting the release of dopamine and acetylcholine respectively, causing motor disturbance. Thus, it was perceived that the increase of ROS or nitratives is indirectly related to the toxicity of the alpha-synuclein protein which, when phosphorylated, indicates preponderant Lewy bodies, a substance found in the brains of PD patients [35, 36].

2.3. Genetic Mechanism

The study of Molecular Biology aids elucidation of the pathogenesis and probability of diagnosis for several diseases. In the case of PD, the studies associate the disease with the genes SNCA, GBA, LRRK2, VPS35, EIF4G1, DNAJC13 and CHCHD, and indirectly with the aging factor, since the disease is closely related to the elderly. The genes mentioned are described in Table 1. They are known or suspected to be involved in sporadic, autosomal dominant and autosomal recessive PD and in atypical forms of parkinsonism, where the most common mutations are in the GBA and LRRK2 genes.

Regarding directly related factors, a series of genetic mutations occur that trigger autosomal dominant and recessive forms, such as synuclein (SNCA), parkin 2 (PARK2), putative 1 kinase induced by PTEN (PINK1), PARK7, leucine kinase repeat rich 2 (LRRK2) and bone marrow stromal cell antigen 1 (BST1). For the indirectly related factor, there is a genetic defect that consists of telomere shortening whereas it is not possible to completely replicate the ends of the linear chromosomes [35, 37]. In the last years, with the improvement of Molecular Biology, it became possible to carry out Genome-Wide Association Studies (GWAS), in which there were more than 7 million variants, in which 26 loci had significant association with PD, mainly sporadic form, *i.e.* no cases in the family. For familial PD cases, Mendelian theory accounts for less than 10% of cases [37].

The main challenge of genetics is to correlate genes with biological activities, such as the parkin gene, which causes the onset of autosomal recessive disease, that regulates myofascia in several models *in vitro* and *in vivo*. However, the true action on dopaminergic neurons to trigger neurodegeneration is still unknown. Studies have also shown that one cause of PD is due to imbalance of autophagy flux in the CNS. The transcription factor EB (TFEB) is responsible for the control of autophagy and lysosomal biogenesis that is expressed by the SNCA gene. TFEB was found in human tissue and a study confirmed animal model of PD [37].

Another important cause for the development of PD is the accumulation of alpha-synuclein proteins. This accumulation occurs from the deformation of the structure of the alpha-helix protein to beta-helices due to the gene expression of the SNCA, from which it is decoded. SNCA mutations cause autosomal dominant parkinsonism and yield comprehension of the molecular basis of synucleinopathies. The most recently identified mutation was p.Ala53Glu (A53E). Due to deformation, the cleavage of this protein is prevented and deposited at specific sites of the nigra region, influencing the activity of dopaminergic neurons and agglomerates of Lewy bodies [38].

These genes are related to the components of the dopaminergic pathway, for example enzymes dopadescarboxylase, MAO-B, catechol-o-methyltransferase (COMT), the monoamine 2 transporter and glycoprotein 2c, among others. When there is a mutation in one of these genes, there is no adequate production of the components and consequently, there will be no dopamine synthesis. Studies have also related some polymorphisms in genes related to the adverse effects that patients present after starting treatment. It was thus identified that COMT rs165815 and drd3 rs6280 are related to hallucinations; DDC rs921451, DDC rs3837091, SLC22A1 rs628031 related to orthostatic hypotension; SLC22A1 rs628031 with peripheral disease; SLC22A1 rs628031 with impulse control disorders; slc22a1 rs628031 with motor fluctuations, DDC rs3837091 and SLC22A1 rs628031 with dyskinesia [39].

In another study, genetic research on the genes SNCA, GBA, LRRK2, VPS35, EIF4G1, DNAJC13 and CHCHD in the population of Parkinson patients from different regions was performed. The combined frequency of Berber and Ashkenazic Jews was identified. Variants in these genes can

Table 1. Indirectly related genes with PD.

Confidence Level	Risk Factors	Autosomal Dominant	Autosomal Recessive	Atypical Parkinsonism
High	GBA LRRK2 GWAS loci: GBA, RAB29-NUCKS1, SIPA1L2, ACMSD-TMEM163, STK39, MCCC1, TMEM175-GAK-DGKQ, BST1, GPNMB, FGF20, INPP5F, MIR4697, CCDC62, GCH1, VPS13C, BCKDK-STX1B, MAPT, SREBF1-RA/1, RIT2, DDRGK1, ITPKB, IL1R2, SCN3A, SATB1, NCKIPSD, CDC71, ALAS1, TLR9, DNAH1, BAP1, PHF7, NISCH, STAB1, ITIH3, ITIH4, ANK2, CAMK2D, ELOVL7, ZNF184, CTSB, SORBS3, PDLIM2, C8orf58, BIN3, SH3GL2, FAM171A1, GALC, COQ7, TOX3, ATP6V0A1, PSMC3IP, TUBG2.	LRRK2 SNCA VPS35	PARK2 (Parkin) PINK1 PARK7 (DJ-1)	ATP13A2 SYNJ1 PLA2G6 ATP6AP2 DNAJC6
Medium	SMPD1 Chr. 22q11.2 deletion GWAS loci: USP25, NMD3, ITGA8.	CHCHD2 DNAJC13 RIC3 TMEM230	VPS13C	RAB39B FBXO7
Low	PARK10 MC1R UCHL1 GIGYF2	EIF4G1	-	-

reach 30 to 40% of all PD cases, whereas in Japanese, Chinese, French Canadian and Spanish populations, they represent 10 and 20% of patients with PD. In the other populations there are less than 10% of patients with PD, therefore, it is perceived that these genes have some relationship with PD. However, it has not yet been possible to explain this relation scientifically [40].

Although several studies show that the individual's genetics triggers the development of PD, it is not possible to say that this prevalence is decisive. Other factors may also trigger PD, such as excessive and continuous use of drugs, alcoholism, repetitive cranial trauma, cerebral ischemia, frequent toxic environments such as manganese, oil and insecticides [31].

2.4. Mitochondrial Defects

To elucidate mitochondrial defects in sporadic PD patients, tissue samples from the CNS were studied after autopsy which indicated that there is a significant reduction in mitochondrial complex activity that apparently correlates with complex damage caused by oxidative stress. Through experiments with MPP⁺, neurotoxins that cause oxidative stress, it has been observed that this substance causes the clinical symptoms of PD affecting specific cells of the mechanism of the disease. However, in other cellular constituents such as lipids, proteins and DNA, oxidative damage from the mitochondrial defect occurred [37].

2.5. Failure of Ubiquitin Proteasome System

The Endoplasmic Reticulum (ER) is a cellular organelle with the function of producing, distributing and degrading proteins whereas this phenomenon is called proteostasis. More specifically, the ER synthesizes proteins according to the related gene. The proteins are then folded to gain three-dimensional conformation and subsequently released. This

process is mediated by the concentration of calcium inside the cell. When failure happens at some stage, which usually occurs due to the homeostatic imbalance of ion input and output (Ca²⁺), the repair mechanism called ubiquitin proteasome system appears to recognize the defective protein and discards it. The ubiquitin proteasome system begins with the adhesion of ubiquitin in the proteins that cover it, signaling to the proteasome of the nerve cell that identifies the marked protein and starts to degrade its amino acids. If the ubiquitin proteasome system fails, proteins that were not properly synthesized and/or did not receive the correct three-dimensional conformation will be disused and deposited. This accumulation of proteins constitute the Lewy bodies [41-43].

3. PARKINSON'S DISEASE DIAGNOSIS

The diagnosis of PD is based on clinical aspects, however, the diagnosis is uncertain at an early stage of the disease, and up to 10-30% of patients initially diagnosed with PD are clinically reclassified, even in specialized units [44].

Nowadays, studies are being conducted to diagnose PD through biomarkers whereas PD could be diagnosed in the future through laboratory methods, not just clinical, reducing thus diagnostic errors. In the initial stage with animals, tests were quite satisfactory using the lipidic ELISA and sFIDA methods [45].

The biomarkers used in most of the studies were taken from the cerebrospinal fluid, blood and saliva. The purpose of the studies was to investigate the diagnosis of PD in the early stages. Table 2 lists the biomarkers used for possible diagnosis of PD. These studies are in the initial phase of testing with promising results, and probably will be an alternative option for confirming the diagnosis of PD [46].

Table 2. Biomarkers used for the diagnosis of neuroimaging of Parkinson's disease.

Cerebrospinal Fluid	Blood	Saliva
α -synuclein, o- α - synuclein, t- α -synuclein	hsa-miR-195, hsa-miR-15b, hsa-miR-221, hsa-miR-181a, hsa-miR-185	α -synuclein; o- α - synuclein; t- α - synuclein
LRRK2		
Cu/Zn-SOD		
<i>Lipid peroxidation assay</i>	phospho- α -synuclein, α -synuclein, oligo- α -synuclein, oligo- phospho- α -synuclein, α -synuclein	
NOx		
<i>Ceruloplasmin ferroxidase</i>		
miR-1; miR-153, miR-409-3p, miR-19b-3p, miR-10a-5p, miR153/mir-409-3p	A. 57 Biomarkers, B. 21 Biomarkers	
	LRRK2	
	iPD	
A β 1–42/t-tau ratio, Tau [T-tau], [P-tau181]	PSMA2	
	LAMB2	
	ALDH1A1	
SKP1A	HIST1H3E	
HSPA8	BC051695.1	
PSMC4	PHR5001	
ALDH1A1	NM_006790.1, NM_032855.1, NM_003141.2, NM_001544.2, NM_024754.2	
HIP2	BC005858.1, BC094687.1; BC027617.1	
-	SNCA/PARK1/4, PRKN/PARK2, L1 (UCHL-1/PARK5), PINK1/PARK6, DJ-1 (DJ1/PARK7), LRRK2/PARK8, VPS35/PARK17, EIF4G1/PARK18	
	miR-626; miR-505; miR-222, miR-1; miR-22; miR-29a; miR-16-2; miR-26a2; miR-30 ^a	
	k-TSP1; k- TSP2; k- TSP3, k-TSP4, k-TSP5; k-TSP1-5; k-TSP1-4; k-TSP1-3; k-TSP1,3,4, SKP1A	
	HSPA8, PSMC4, ALDH1A1, HIP2	
	BC051695.1	

Parnetti *et al.* [47] employed the detection of α -synuclein (a-syn) by ELISA to differentiate PD patients from healthy controls with 82% sensitivity and 71% specificity and an area under the curve (AUC) of 0.87. Kühbach *et al.* [48] reported a LOD of 18 fM for a-syn in CSF and 14 fM for a-syn in blood.

The most commonly used clinical criteria for the diagnosis of PD are described according to the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank or UKPDS-BB [49]. This bank divides the diagnosis into 3 steps. The first step indicates a "probable" PD that includes the presence of bradykinesia which is one of the major signs of PD associated with others such as those described above. Step 2 includes signs and symptoms such as history of repeated strokes with gradual progression of parkinsonian features, history of cra-

nial trauma, history of definite encephalitis, among others that exclude the onset of PD suggesting other causes of parkinsonism. Finally, step 3 should include three or more characteristic signs and symptoms of PD to complete the diagnosis [27].

However, currently the most commonly used clinical diagnosis that is replacing the UKPDS-BB is the MDS Clinical Diagnostic Criteria, which obtains the result of probable, possible and non-PD. This clinical diagnosis is based on performing reflex tests, coordination, muscle strength and mental function of the patient. The main symptoms observed in the diagnosis of PD are: Tremor (rest and/or movement tremor), bradykinesia (slow movements), rigidity and postural alteration (which may cause imbalance and/or fall) [43, 50] (Table 3).

Additional clinical features include secondary motor symptoms (hypomimia, dysarthria, dysphagia, sialorrhea, micrographia, gait, festination, postural instability, freezing, dystonia, glabellar reflexes) and non-motor symptoms (autonomic dysfunction, cognitive/neurobehavioral abnormalities, such as anosmia, paresthesias and pain) [51, 52].

Table 3. The most common major signs and symptoms in patients with Parkinson's disease.

Tremors in rest	Common on the lips, chins and tongue; the trembling of the hands increases with walking and can be an early sign when other signs are not present; It can be aggravated by stress.
Muscle stiffness	It presents increased resistance to passive movement, causing underlying tremor (not visible tremor).
Postural abnormalities	Tilt of the head, arms held in front of the body and elbows, hips and knees bent, ulnar deviation of the hands, reversed feet and side inclination of the body; They are not specific symptoms of PD.
Bradykinesia and Hypokinesia	Slowness and loss of automatic movements; decreased range of repetitive movements, such as decreased blinking rate, decreased spontaneous expression of the face, loss of gesticulation; speech becomes low, slow handwriting with small letters; slow walk (shorter step and tend to drag their feet), difficulty in swallowing.
Loss of postural reflexes	Risk of falling, inability to stand (accelerated gait, with small steps and tendency to lean forward).
Rigidity	Temporary inability to perform active movements (affects the legs when walking), opening the lids, speaking and writing.

Although these criteria are widely used, many problems with the diagnosis of PD remain unresolved, such as: heterogeneity of clinical forms, frequent asymmetry, exclusively unilateral onset (preferential in hand), among others [53].

The investigation of molecular activity at the level of cellular pathways is also being a way to be explored in the understanding and as a basis for diagnosis of PD. The main characteristics of the disease are defined in a database, associating specific genes. Thus, it is possible to associate the molecular network involved in the function of the disease [54].

In addition to the clinical criteria used, the diagnosis can be confirmed by some magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT) findings whereas it is possible to observe the difference in the black matter of a normal person and a patient with PD by MR [55].

These are the main tests used for the differentiation of PD, Progressive Supranuclear Palsy (PSP) and autonomic dysfunction suggestive of Multiple System Atrophy (MSA). In addition, CT is used to differentiate PD from atypical and secondary parkinsonism, as a complementary diagnosis for early PD and for the detection of individuals at risk of developing PD. However, although the techniques are modern,

they are not able to detect cerebral abnormalities that represent the pathological substrate of PD [55-57].

Neuroimaging is another technique that helps differentiate PD with other parkinsonian syndromes. The method uses radiotracers that have high affinity for several target molecules essential for the transport and synthesis of dopamine. All these radiotracers can be considered biological markers (biomarkers) of nigrostriatal dopaminergic degeneration [58].

As an example, the benzodiazepine 11C- (R) -PK11195 peripheral ligand, a selective marker of activated microglia is used to visualize brain inflammation *in vivo* in PD patients. The presynaptic dopamine transporter (DAT), is responsible for the absorption of high affinity dopamine. It is found exclusively in dendrites and axons of dopaminergic neurons and is a potential marker of integrity of nigrostriatal projections. Various PET ligands (11C-CFT, 18F-CFT, 18F-FP-CIT and 11C-RTI-32) and SPECT tracers (such as 123I-β-CIT, 123I-FP-CIT, 123I-altropane, 11C-methylphenidate and 99mTc -TRODAT1) are now available to measure the availability of DAT [59].

Another more recent technique to aid the diagnosis is the identification of degeneration markers (proteins), such as α-suculein, Lewis body, among others, in biological fluids of patients with the pathology. However, this technique is still in the development phase [60].

A strategy that is being used in diagnostic studies for PD is the investigation of non-coding RNAs (micro-RNAs or miRNA), single-stranded RNA, found between 21 and 25 nucleotides whereas the main function is to act as post-transcriptional silencers as they pair with specific mRNAs and regulate stability and translation. Studies involving circulating miRNAs have been shown to be promising in the diagnosis and prognosis of neurodegenerative diseases, mostly PD. The correlation involving the miRNA dysregulation and the PD was obtained from the studies of a homozygous conditional mouse model with the CRE recombinase model generated under the regulation of the DA transporter promoter. This leads to the specific deletion in dopaminergic neurons whereas it is verified that specific miRNAs are capable of targeting PD-related genes and thereby modulate their functions in different cellular and animal models [61].

4. PHARMACOLOGICAL TREATMENT

The PD remains without cure therefore the pharmacological treatment is aimed primarily at controlling symptoms. The availability of treatment enables the possibility to maintain a good functional mobility, increasing the life expectancy of patients [62]. For this, studies are conducted to develop new drugs, using animal models such as rodents that help both the development of drugs and better understanding of pathophysiology and symptoms [63].

The pharmacological approach aims primarily to restore dopaminergic activity which is reduced. However, the antiparkinsonian drugs cause many side effects, which determine that they should be used only when symptoms are impairing job performance or daily tasks. Currently, the pharmacological treatments can function as dopaminergic sup-

plementations with levodopa, COMT, anticholinergics, dopamine agonists and MAO-B inhibitors [64].

4.1. Dopaminergic Supplementation

The levodopa (L-dopa) is a drug considered as first line treatment for PD, and is always associated with a COMT inhibitor in the same formulation (levodopa and carbidopa) or with a dopamine decarboxylase inhibitor (levodopa and benserazide). It is a dopamine precursor which is able to penetrate the blood-brain barrier. The L-dopa is decarboxylated by the action of the dopa decarboxylase enzyme, thus increasing the amount of dopamine in the substantia nigra [64, 65].

A large amount of this drug, which is administered orally, is decarboxylated by the action of MAO present in the intestinal mucosa and other peripheral sites. The release of dopamine in peripheral circulation by this conversion causes many side effects, particularly nausea. It is also for this reason that only 1-3% of the administered levodopa arrives unaltered to the brain [4].

In order to reduce the concentration of levodopa that is degraded systemically, and decrease the dose which is administered daily, the drug is associated with other drugs (inhibitors of enzymes which metabolize dopamine). These associations can reduce the peripheral metabolism of levodopa and increase its plasma levels, with consequent increase in plasma half-life and concentration of dopamine in the cerebral circulation [66].

The use of this drug causes various side effects, among which we can mention gastrointestinal effects such as anorexia, nausea and vomiting that appear when levodopa is used without combination with inhibitors; cardiovascular effects (patients taking levodopa may present cardiac arrhythmias, including tachycardia, ventricular premature beats and atrial fibrillation, effects attributed to the formation of peripheral catecholamines); dyskinesia in 80% of patients that receive L-Dopa treatment for a long period indicating involuntary movements of writhing (dyskinesia); ON-OFF effect; with continued use of levodopa there may be fluctuations of the patient's clinical status; rigidity and hypokinesia worsen suddenly and may last a few minutes or even hours. The ON-OFF effect can make the patient stop walking suddenly and make the patient feel attached to the ground [4].

The carbidopa, unlike levodopa, carbidopa does not cross the blood-brain barrier. Its action is to inhibit only the extracerebral decarboxylation of levodopa, leaving more levodopa available at its place of action [67].

4.2. Dopaminergic Drugs

Dopamine agonists act on the postsynaptic dopamine receptors, does not require enzymatic conversion to carry out its activity. These drugs are more effective than L-dopa in the treatment of late stage PD. They may also be used in combination with levodopa in PD advanced stages to assist in the control of motor complications. These drugs can be classified into non-ergot and ergot (ergot derivatives); however, the latter is not often indicated due to the side effects that the drug produces [68].

The actions of dopamine in the brain are mediated by a family of receptors of this neurotransmitter. There are five different types of dopamine receptors in the brain, but in PD the most important are D1 and D2. They are located in the nigrostriatal region responsible for motor body control. The most widely used drugs are those not derived from ergot: pramipexole, ropinirole, rotigotine, apomorphine; and derivatives of ergot: pergolide, bromocriptine, cabergoline, lisuride (Table 4). These drugs act directly on those receptors [69].

Apomorphine is a semi-synthetic alkaloid derivative that presents agonist action at dopamine receptors in nigrostriatal pathways. It is a potent drug with the disadvantage of having to be administered parenterally and can also be administered subcutaneously by the patient itself at a dose of 1-2 mg (equivalent to 0.1-0.2 mL of the commercial preparations), leading to a reversal of the off state in less than 10 minutes and the effect lasting between 60-80 minutes, and can be repeated every 3 hours, if necessary, and is also widely used for research related to PD induction in animals and treatment [70].

Bromocriptine was the first dopamine agonist used in the treatment of PD. It has a strong action on the D2 receptor and is a partial agonist of D1 receptors. The drug does not require enzymatic conversion to perform its activity and does not depend on the functional capacity of the nigrostriatal neurons. It is more effective than L-dopa in the treatment of late stage PD [71].

Cabergoline, has higher affinity for D2 receptors and lower affinity for α_1 and α_2 adrenergic D1 receptors [72]. Lisuride, shows potential affinity for dopamine receptors [73]. Pergolide is a dopaminergic agonist drug that exhibits antiparkinsonian properties by directly stimulating the D1 and D2 receptors. This drug has a satisfactory efficacy for patients that never received Levodopa [74].

Piribedil has affinity for the D2 and D3 receptors and is also an α_2 -adrenergic antagonist. It presents side effects: postural hypotension, somnolence and gastrointestinal disorders [75].

Pramipexole, is a dopaminergic agonist of the D2 subfamily of dopaminergic receptors with greater affinity for the D3 rapidly absorbed after oral administration, with bioavailability higher than 90%. The maximum plasma concentration occurs within 1 to 3 h, half-life is 10 h. Only 10% of the drug is metabolized and eliminated by the kidneys. A positive characteristic of this drug is that it does not significantly bind to plasma proteins and does not suffer interference from co-administration with food. The most common side effects are excessive daytime sleepiness, orthostatic hypotension, dizziness, insomnia and hallucinations [76]. This drug is available on immediate release (IR), and a once-daily extended release (ER) formula [77]. Ropinirole has high affinity for the D2 subfamily of dopamine receptors (D2, D3 and D4). The side effects are similar to those of pramipexole [78]. For Rotigotine, its mechanism of action is not well elucidated, however, this drug has affinity to D1, D2 and D3 receptors promoting the improvement of dopaminergic transmission in the basal region [79]. Rotigotine is a dopaminergic agonist with action

at the D1 dopamine receptor. Its mechanism of action is not very clear, as it is not directly related to the improvement of motor symptoms. However, a significant improvement in patient sleep and pain caused by fluctuation due to excess dopamine, which occurs when there is prolonged use of levodopa, has been observed. However, a study of conjugated rotigotine to polyoxazoline polymer demonstrated increased half-life of the drug and decreased the motor symptoms of rats with PD, indicating that in future this will be the new formulation for use of the transdermal patch containing rotigotine [80].

Another study carried out in Brazil by the Federal University of Pernambuco with 224 Parkinson patients with visual hallucinations showed that patients taking rotigotine had 4 times more prevalence and rasagiline 3 times more than the other antiparkinsonian drugs used (Table 4). In addition, the drug should be used with medical follow-up due to this side effect [81].

4.3. Monoamine Oxidase B Inhibitors

The monoamine oxidases (MAO) are enzymes responsible for the decarboxylation of catecholamines. There are two isoforms, MAO-A which mainly metabolizes serotonin and noradrenaline and MAO-B which metabolizes dopamine. The reduction of monoamine oxidase B activity results in an increase in the amount of dopamine in the neurons, in addition, MAO-B is directly related to conversion of the toxic substance MPTP (methyl-phenyl-tetrahydropyridine), which causes Parkinsonian syndrome, in its neurotoxic form MPP⁺. This form inhibits the enzyme NADH CoQ1 resulting in excessive production of free radicals leading to inhibition of mitochondrial respiration that contributes to neuronal injury through death by apoptosis in the substantia nigra [3].

The MAO-B inhibitors are associated with L-dopa, increasing levels of dopamine in the synaptic cleft and providing a symptomatic improvement. However, the MAO-B inhibitors bind irreversibly to the enzyme that causes various side effects, especially due to interactions with sympathomimetic drugs and foods containing tyramine, resulting in severe hypertensive reactions [82]. The selegiline and rasagiline (Table 4) is the most used drugs of this class, however, recently a new MAO-B inhibitor, safinamide, appeared in the market (Table 4).

Selegiline or L-Deprenyl is an irreversible inhibitor of MAO-B enzyme. Brain dopamine released after the synapse is recaptured by the presynaptic neuron [83].

The rasagiline mesylate is a selective and irreversible inhibitor of MAO-B enzyme. The mechanism of action is performed by one of its metabolites, the 1-aminoindan, but is not MAO-B, so it has been proposed that this drug presents a neuroprotective action mechanism which is independent of the inhibition of MAO B [84].

Safinamide is a reversible MAO-B inhibitor drug used as a co-complementary treatment for levodopa to reduce adverse effects such as fluctuation. Some countries still do not recognize it as a drug for use in PD pharmacotherapy. Studies have revealed that safinamide has more than one mechanism of action, such as inhibition of Na⁺ and Ca²⁺ channels

and inhibition of glutamate release. Regarding the dyskinesia symptom, the effect of the drug can be observed after a long time of treatment, since there is no significant improvement at the beginning of treatment [85] (Table 4).

4.4. Catechol-o-methyltransferase Inhibitors

The COMT is an enzyme involved in DA metabolism and consequently of levodopa. Drugs that act inhibiting the enzyme increases the bioavailability of dopamine in the synaptic cleft. Generally, these COMT inhibitors are associated with levodopa to prolong its therapeutic effect and reduce the side effects, such as motor fluctuations that dopaminergic supplementation causes. These drugs (entacapone and tolcapone in Table 4) used in the initial phase of PD, are relatively new and are among the most studied nowadays for the treatment of PD. Despite their therapeutic potency, prolonged usage for up to six weeks can cause diarrhea and hepatotoxicity [86].

Brooks *et al.* [87] conducted a study to compare the drug efficacy of a group using levodopa/carbidopa, and a group using levodopa/carbidopa/entacapone under UPDRS II (average on-off state) in parkinsonian patients that did not show floatation. It was observed that after six months of treatment, the second drug combination showed a slight superiority over the first (down from 0.6 points to 0.1 points).

Entacapone inhibits the enzyme COMT which is responsible for the metabolism of dopamine in the synaptic cleft [88], is a reversible COMT inhibitor, an enzyme that metabolizes levodopa to 3-O-methyl-dopa and increases the amount of levodopa available peripherally.

Tolcapone, is one of the drugs most studied for the treatment of PD acting by inhibiting the enzyme COMT [89].

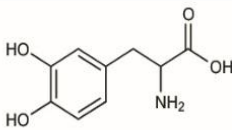
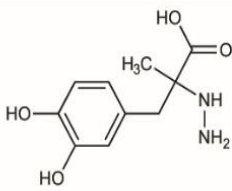
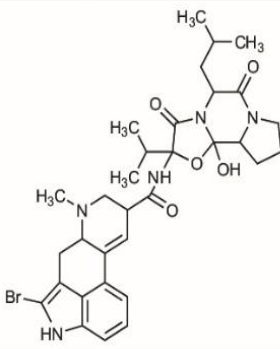
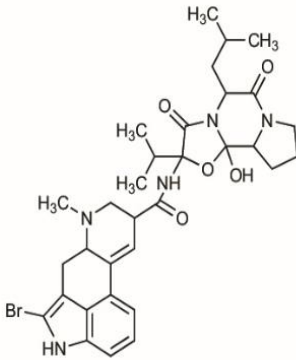
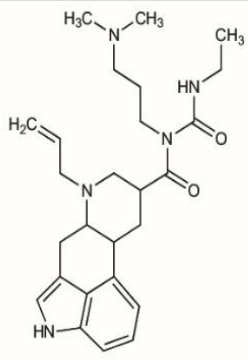
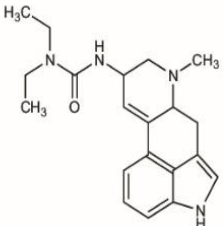
Opiocapone is used in combination with levodopa/DOPA decarboxylase inhibitors, because fluctuations are related to a reduction in the effect of levodopa, switching the patient to the on state (where the disease is controlled), in which it is able to move to the off state (where symptoms reappear), which presents difficulty in movements. This drug is available as capsules (25 mg and 50 mg) for oral administration [90].

4.5. Anticholinergic Drugs

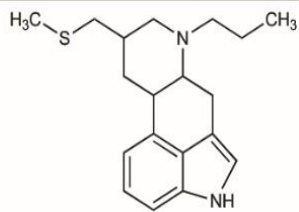
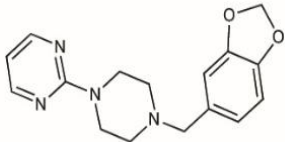
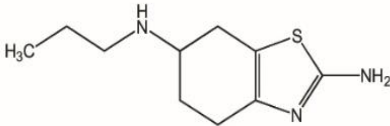
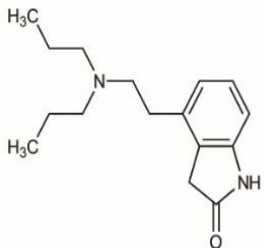
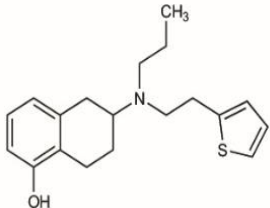
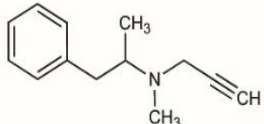
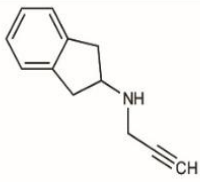
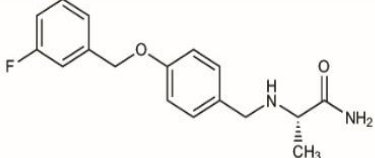
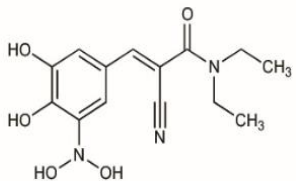
Anticholinergic drugs were one of the first treatments widely used for PD, and long remained the only therapeutic option for this disease. The anticholinergic action mechanism is still unknown, although it is suggested action on the imbalance between striatal dopamine and cholinergic activity in the cholinergic, muscarinic and nicotinic receptors. Anticholinergics (biperiden, piribedil and trihexyphenidyl shown in the Table 4) used in PD are specific for muscarinic receptors, which act by blocking the muscarinic receptors with the objective of increasing the dopamine concentration in the synaptic cleft therefore controlling the tremor characteristic of the disease. However, these drugs are ineffective for control of bradykinesia and stiffness [91].

It is believed that anticholinergic drugs have more side effects than other drugs used to treat PD, in particular with

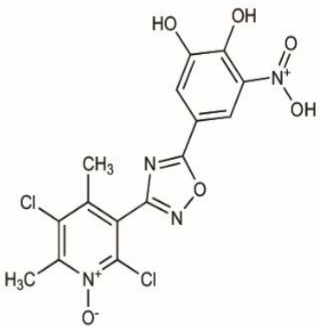
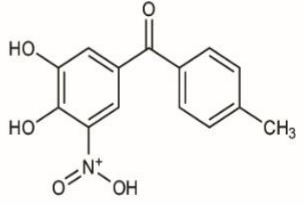
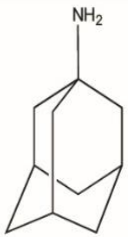
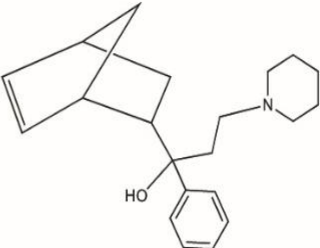
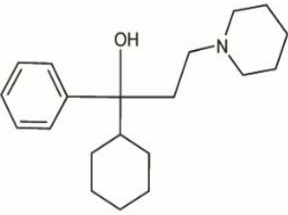
Table 4. Classes of antiparkinsonian drugs.

Drug	Mechanism of Action	Molecular Structure	Refs.
Levodopa	Dopaminergic supplementation		[4, 64, 65]
Carbidopa	Dopaminergic supplementation		[67]
Apomorphine	Dopaminergic drug		[70]
Bromocriptine	Dopaminergic drug		[71]
Carbegoline	Dopaminergic drug		[72]
Lisuride	Dopaminergic drug		[73]

(Table 4) Contd....

Drug	Mechanism of Action	Molecular Structure	Refs.
Pergolide	Dopaminergic drug		[74]
Piribedil	Dopaminergic drug		[75]
Pramipexole	Dopaminergic drug		[76, 77]
Ropinirole	Dopaminergic drug		[78, 79]
Rotigotine	Dopaminergic drug		[80]
Selegiline	Monoamine oxidase B inhibitor		[83]
Rasagiline	Monoamine oxidase B inhibitor		[84]
Safinamide	Monoamine oxidase B inhibitor		[85]
Entacapone	Catechol-o-methyltransferase inhibitor		[88, 89]

(Table 4) Contd....

Drug	Mechanism of Action	Molecular Structure	Refs.
Opicapone	Catechol-o-methyltransferase inhibitor		[89]
Tolcapone	Catechol-o-methyltransferase inhibitor		[90]
Amantadine	Anticholinergic drug		[93, 94]
Biperiden	Anticholinergic drug		[95]
Trihexyphenidyl	Anticholinergic drug		[96]

regard to cognitive and neuropsychiatric symptoms. They can also cause blurring as collateral visual effects with limited accommodation, urinary retention and nausea. All these effects are more common in the elderly or in patients with cognitive disorders. Therefore, the use of anticholinergic drugs is not indicated for patients with dementia [92]. Table 4 shows the main drugs used in the treatment of PD with description of their mechanism of action and molecular structure.

Amantadine potency is considerably lower than Levodopa and the investigations of the mechanism of action indicates dopaminergic activity in D2 receptors [93]. With the adverse effect of dyskinesia due to prolonged usage of levodopa, studies have been done with amantadine that demonstrated significant antidyskinetic effects in PD models in

animals and in randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials of PD patients. The hypothesis of the mechanism of action suggested by the studies is regarding the blockade of NMDA receptors that modulate the glutamatergic-dopaminergic-cortico-striatal interactions involved in the genesis of neurodegenerative diseases. There are three pharmaceutical forms of amantadine currently available on the market: an immediate release oral formulation, which is widely available; a sustained release formulation (ADS-5102) which has been recently developed and approved by the FDA; and an intravenous infusion solution, which is not commonly used in clinical practice [94].

Biperiden is an older drug used for the treatment of PD. Its mechanism of action is based on the reduction of cholin-

ergic activity, contributing to the reestablishment of acetylcholine and dopamine in the nigrostriatal region [95].

Trihexyphenidyl (THP) has a mechanism of action to inhibit cholinergic activity, contributing to the reestablishment of acetylcholine and dopamine in the nigrostriatal region [72]. An *in vivo* study in mice with dopamine deficiency demonstrated that direct infusion of THP into the striatum increased the extracellular DA neurotransmitter to normal levels, indicating that the site of action is the striatum. This action is probably due to THP acting directly on M1 and / or M4 mAChRs in SPNs to increase DA release *via* known retrograde endocannabinoid signaling between spiny projection neurons and DA neurons or axonal collateral pathways in cholinergic interneurons [96].

CONCLUSION

Based on the literature review carried out in this study, it is possible to perceive that research is advancing for discovering new mechanisms of the pathophysiology of PD allowing the development of new safer and more effective drugs. The treatments currently used are limited to the improvement of the quality of life of patients, reducing or delaying symptoms. For some patients the treatment is inadequate, making the person unable to perform daily activities, facilitating the development of depression which results in greater need of attention by the caregiver.

On the other hand, diagnostic techniques are advancing. Initially, the diagnosis was only clinical, whereas there is now the possibility of performing imaging tests that identify changes in the region of the substantia nigra that are common among Parkinson patients. Another prospective diagnostic is the ELISA test to detect some characteristic biomarkers of PD, this will decrease the cost of diagnosis and make it more affordable for everyone. With the possibility of identifying PD in the initial phase, the treatment will be more effective due to neuroprotection and thus delay neuronal death.

Considering these aspects of PD, understanding the pathogenesis mechanism is extremely important so that drugs can be developed to treat the cause and therefore cure the patient.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

We acknowledge support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Ikeda-Matsuo, Y.; Miyata, H.; Mizoguchi, T.; Ohama, E.; Naito, Y.; Uematsu, S.; Akira, S.; Sasaki, Y.; Tanabe, M. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor in dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, **2019**, *124*, 81-92.
- [2] Miyanishi, K.; Choudhury, M.E.; Watanabe, M.; Kubo, M.; Nomoto, M.; Yano, H.; Tanaka, J. Behavioral tests predicting striatal dopamine level in a rat hemi-Parkinson's disease model. *Neurochem. Int.*, **2019**, *122*, 38-46.
- [3] Rocha, M.D.; Viegas, F.P.; Campos, H.C.; Nicastro, P.C.; Fossaluzza, P.C.; Fraga, C.A.; Barreiro, E.J.; Viegas, C.Jr. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II: Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **2011**, *10*(2), 251-270.
- [4] Santos, V.L. Perfil epidemiológico da doença de Parkinson no Brasil, *Centro universitário de Brasília.*, **2015**.
- [5] Barbosa, A.F.; Voos, M.C.; Chen, J.; Francato, D.C.V.; Souza, C.O.; Barbosa, E.R.; Chien, H.F.; Mansur, L.L. Cognitive or cognitive-motor executive function tasks? Evaluating verbal fluency measures in people with parkinson's disease. *BioMed Res. Int.*, **2017**, *2017*, 1-7.
- [6] Tan, L.C.; Venketasubramanian, N.; Jamora, R.D.; Heng, D. Incidence of Parkinson's disease in Singapore. *Parkinsonism Rel. Disord.*, **2007**, *13*(1), 40-43.
- [7] Song, J.; Kim, J. Degeneration of dopaminergic neurons due to metabolic alterations and Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.*, **2016**, *8*(65), 1-11.
- [8] Caixeta, L.; Vieira, R.T. Demência na Doença de Parkinson. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, **2008**, *30*(4), 375-383.
- [9] Muangpaisan, W.; Hori, H.; Brayne, C. Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's Disease in Asia. *J. Epidemiol.*, **2009**, *19*(6), 281-293.
- [10] Tan, L.C.S. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol. Asia*, **2013**, *18*(3), 231-238.
- [11] Lau, L.M.L.; Breteler, M.M.B. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, **2006**, *5*(6), 525-535.
- [12] Bellou, V.; Belbasis, L.; Tzoulaki, I.; Evangelou, E.; Ioannidis, J.P.A. Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Rel. Disord.*, **2016**, *23*, 1-9.
- [13] Onozawa, R.; Tsugawa, J.; Tsuboi, Y.; Fukae, J.; Mishima, T.; Fujioka, S. The impact of early morning off in Parkinson's disease on patient quality of life and caregiver burden. *J. Neurol. Sci.*, **2016**, *364*, 1-5.
- [14] Pereira, M.C.L.; Suzuki, D.E.; Janjoppi, L.; Okamoto, O.K. Strategies for neuronal recovery in experimental models of Parkinson's disease. *Einstein*, **2007**, *5*(4), 387-391.
- [15] Abbas, M.M.; Xu, Z.; Tan, L.C.S. Epidemiology of Parkinson's Disease-East Versus West. *Mov. Disord. Clin. Pract.*, **2017**, *5*(1), 14-28.
- [16] Dorsey, E.R.; Constantinescu, R.; Thompson, J.P.; Biglan, K.M.; Holloway, R.G.; Kieburtz, K.; Marshall, F.J.; Ravina, B.M.; Schifitto, G.; Siderowf, A.; Tanner, C.M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, **2007**, *68*(5), 384-386.
- [17] Huot, P.; Sgambato-Faure, V.; Fox, S.H.; McCreary, A.C. Serotonergic approaches in Parkinson's Disease: Translational perspectives, an update. *ACS Chem. Neurosci.*, **2017**, *8*(5), 973-986.
- [18] Gallese, V.; Cuccio, V. The neural exploitation hypothesis and its implications for an embodied approach to language and cognition: Insights from the study of action verbs processing and motor disorders in Parkinson's disease. *Cortex*, **2018**, *100*, 215-225.
- [19] Braak, H.; Del Tredici, K.; Rüb, U.; de Vos, R.A.; Jansen Steur, E.N.; Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, **2003**, *24*(2), 197-211.
- [20] Wise Jr., J.P.; Price, C.G.; Amaro, J.A.; Cannon, J.R. Autophagy disruptions associated with altered optineurin expression in extranigral regions in a rotenone model of Parkinson's Disease. *Front. Neurosci.*, **2018**, *12*, 289.
- [21] Silva, P.G.C.; Domingues, D.D.; Carvalho, L.A.; Allodi, S.; Correa, C.L. Neurotrophic factors in Parkinson's disease are regulated by exercise: Evidence-based practice. *J. Neurol. Sci.*, **2016**, *363*, 5-15.

- [22] Youdim, M.B.H. Monoamine oxidase inhibitors, and iron chelators in depressive illness and neurodegenerative diseases. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, **2018**, 125(11), 1719-1733.
- [23] Broski, S.M.; Hunt, C.H.; Johnson, G.B.; Morreale, R.F.; Lowe, V.J.; Peller, P.J. Structural and functional imaging in parkinsonian syndromes. *RadioGraphics*, **2014**, 34(5), 1273-1292.
- [24] Choudhry, H.; Perlmuter, L.C. Non CNS pathogenic origin of Parkinson's disease. *J. Neurol.*, **2017**, 264(9), 2027-2030.
- [25] Mori, I. Viremic attack explains the dual-hit theory of Parkinson's disease. *Med. Hypothes.*, **2017**, 101, 33-36.
- [26] Braak, H.; Braak, E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J. Neurol.*, **2000**, 247(Suppl. 2), II3-II10.
- [27] Butt, A.H.; Rovini, E.; Dolciotti, C.; De Petris, G.; Bongioanni, P.; Carboncini, M.C.; Cavallo, F. Objective and automatic classification of Parkinson disease with Leap Motion controller. *Biomed. Eng. Online*, **2018**, 17(168), 1-21.
- [28] Mironova, Y.S.; Zhukova, I.A.; Zhukova, N.G.; Alifirova, V.M.; Izhboldina, O.P.; Latypova, A.V. Parkinson's disease and glutamate excitotoxicity. *Zh Nevrol. Psikiatr. Im. S S Korsakova*, **2018**, 118(6. Vyp. 2), 50-54.
- [29] Caggiu, E.; Arru, G.; Hosseini, S.; Niegowska, M.; Sechi, G.; Zarbo, I.R.; Sechi, L.A. Inflammation, Infectious Triggers, and Parkinson's Disease. *Front. Neurol.*, **2019**, 10(122), 1-9.
- [30] Kalia, L.V.; Lang, A.E. Parkinson's disease. *Lancet*, **2015**, 386(9996), 896-912.
- [31] McKinley, E.T.; Baranowski, T.C.; Blavo, D.O.; Cato, C.; Doan, T.N.; Rubinstein, A.L. Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **2005**, 141(2), 128-137.
- [32] Kaur, R.; Mehan, S.; Singh, S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: Pathophysiology to management. *Neurol. Sci.*, **2019**, 40(1), 13-23.
- [33] Braun, G.H.; Jorge, D.M.M.; Ramos, H.P.; Alves, R.M.; da Silva, V.B.; Giuliani, S.; Sampaio, S.V.; Taft, C.A.; Silva, C.H.T.P. Molecular dynamics, flexible docking, virtual screening, ADMET predictions, and molecular interaction field studies to design novel potential MAO-B inhibitors. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2008**, 25(4), 347-355.
- [34] Souza, L.R.; Picanço, R.M.; Pinheiro, A.A.; Silva, K.R.; Taft, C.A.; da Silva, C.H.T. de P.; Santos, C.B.; Hage-Melim, L.I.S. Development of Monoamine Oxidase B inhibitors with Antiparkinson activity. *Curr. Phys. Chem.*, **2016**, 6, 40-52.
- [35] Cacabelos, R. Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18(3), 551.
- [36] Liu, C.; Liang, M.C.; Soong, T.W. Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. *Front. Neurosci.*, **2019**, 13(114), 1-10.
- [37] Redenšek, S.; Trošt, M.; Dolžan, V. Genetic determinants of Parkinson's Disease: Can they help to stratify the patients based on the underlying molecular defect? *Front. Aging Neurosci.*, **2017**, 9(20), 1-17.
- [38] Picillo, M.; Lizarraga, K.J.; Friesen, E.L.; Chau, H.; Zhang, M.; Sato, C.; Rooke, G.; Munhoz, R.P.; Rogaeva, E.; Fraser, P.E.; Kalia, S.K.; Kalia, L.V. Parkinsonism due to A53E α -synuclein gene mutation: Clinical, genetic, epigenetic, and biochemical features. *Mov. Disord.*, **2018**, 33(12), 1950-1955.
- [39] Redenšek, S.; Flisar, D.; Kojovic, M.; Kramberger, M.G.; Georgiev, D.; Pirtosek, Z.; Trošt, M.; Dolžan, V. Dopaminergic pathway genes influence adverse events related to dopaminergic treatment in Parkinson's disease. *Front. Pharmacol.*, **2019**, 10(8), 1-10.
- [40] Gan-Or, Z.; Liang, C.; Alcalay, R.N. GBA-Associated Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Curr. Neurol. Neurosci.*, **2018**, 18(8), 44.
- [41] Nussbaum, R.L.; Ellis C.E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, **2003**, 348, 1356-1364.
- [42] Periquet, M.; Fulga, T.; Myllykangas, L.; Schlossmacher, M.G.; Feany, M. Aggregated α -synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *J. Neurosci.*, **2007**, 27(12), 3338-3346.
- [43] Surmeier, D.J.; Obeso, J.A.; Halliday, G.M. Parkinson's disease is not simply a prion disorder. *J. Neurosci.*, **2017**, 37(41), 9799-9807.
- [44] Drotár, P.; Mekyska, J.R.; Rektorová, I.; Masarová, L.; Směkal, Z.; Faundez-Zanuy, M. Evaluation of handwriting kinematics and pressure for differential diagnosis of Parkinson's disease. *Artif. Intell. Med.*, **2016**, 67, 39-46.
- [45] Wei, Z.; Li, X.; Li, X.; Liu, Q.; Cheng, Y. Oxidative stress in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Front. Mol. Neurosci.*, **2018**, 11(236), 1-7.
- [46] Costa, M.F.B.N.A.; Reisdorfer, E.; Kempfer, S.S.; Porporatti, A.L.; Canto, G.L. Validade diagnóstica de biomarcadores na doença de Parkinson: Revisão sistemática e meta-análise. *Ver. Bras. Enferm.*, **2018**, 71(6), 3250-3259.
- [47] Parnetti, L.; Chiasserini, D.; Persichetti, E.; Eusebi, P.; Varghese, S.; Qureshi, M.M.; Dardis, A.; Deganuto, M.; De Carlo, C.; Castrioto, A.; Balducci, C.; Paciotti, S.; Tambasco, N.; Bembi, B.; Bonanni, L.; Onofri, M.; Rossi, A.; Beccari, T.; El-Agnaf O.; Calabresi, P. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and α -synuclein in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, **2014**, 29(8), 1019-1027.
- [48] Kuhbach, K.; Hülsemann, M.; Herrmann, Y.; Kravchenko, K.; Kulawik, A.; Linnartz, C.; Peters, L.; Wang, K.; Willbold, J.; Willbold, D.; Bannach, O. Application of an amyloid β oligomer standard in the sFIDA assay. *Front. Neurosci.*, **2016**, 10(8), 1-6.
- [49] Gibb, W.R.G.; Lees, A.J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, **1988**, 51(6), 745-752.
- [50] Argaud, S.; Verin, M.; Sauleau, P.; Grandjean, D. Facial Emotion Recognition in Parkinson's disease: A review and new hypotheses. *Mov. Disord.*, **2018**, 33(4), 554-567.
- [51] Postuma, R.B.; Berg, D.; Stern, M.; Poewe, W.; Olanow, C.W.; Oertel, W.; Obeso, J.; Marek, K.; Litvan, I.; Lang, A.E.; Halliday, G.; Goetz, C.G.; Gasser, T.; Dubois, B.; Chan, P.; Bloem, B.R.; Adler, C.H.; Deuschl, G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, **2015**, 30(12), 1591-1601.
- [52] Hustad, E.; Skogholt, A.H.; Hveem, K.; Aasly, J.O. The accuracy of the clinical diagnosis of Parkinson disease. The HUNT study. *J. Neurol.*, **2018**, 265(9), 2120-2124.
- [53] Basortini, O.G.P.; Felício, A.C.; Aquino, C.C.H.A.; Pedrosa, J.L. Progressive supranuclear palsy: New concepts. *Arq. Neuropsiquiatr.*, **2010**, 68(6), 938-946.
- [54] Glaab, E. Computational systems biology approaches for Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.*, **2018**, 373(1), 91-109.
- [55] Oliveira, R.V.; Pereira, J.S. O papel da difusão por ressonância magnética na doença de Parkinson e no diagnóstico diferencial com parkinsonismo atípico. *Radiol. Bras.*, **2017**, 50(4), 250-257.
- [56] Modrego, P.J.; Fayed, N.; Artal, J. Correlation of findings in advanced MRI techniques with global severity scales in patients with Parkinson disease. *Acad. Radiol.*, **2011**, 18(2), 235-241.
- [57] Zaaroor, M.; Sinai, A.; Goldsher, D.; Eran, A.; Nassar, M.; Schelensiger, I. Magnetic resonance-guided focused ultrasound thalamotomy for tremor: A report of 30 Parkinson's disease and essential tremor cases. *J. Neurosurg.*, **2018**, 128(1), 202-210.
- [58] Felício, A.C.; Shih, M.C.; Cordeiro-Junior, C.; Andrade, L.A.F. Molecular imaging studies in Parkinson's disease: Reducing diagnostic uncertainty. *Neurologist*, **2009**, 15(1), 6-16.
- [59] Pavese, N.; Brooks, D.J. Imaging neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, 1792(7), 722-729.
- [60] Foulds, P.; Mann, D.M.A.; Mitchell, J.D.; Allsop, D. Parkinson disease: Progress toward a molecular biomarker for Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.*, **2010**, 6(7), 359-361.
- [61] Leggio, L.; Vivarelli, S.; L'Episcopo, L.; Tirole, C.; Caniglia, S.; Testa, N.; Marchetti, B.; Iraci, N. microRNAs in Parkinson's disease: From pathogenesis to novel diagnostic and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18(12), 2698.
- [62] Crispo, J.A.G.; Fortin, Y.; Thibault, D.P.; Emons, M.; Bjerre, L.M.; Kohen, D.E.; Perez-Lloret, S.; Mattison, D.; Willis, A.W.; Krewski, D.L. Trends in inpatient antiparkinson drug use in the USA, 2001-2012. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **2015**, 71(8), 1011-1019.
- [63] Francardo, V.; Bez, F.; Wieloch, T.; Nissbrandt, H.; Ruscher, K.; Cenci, M.A. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain*, **2014**, 137(Pt 7), 1998-2014.
- [64] Poewe, W.; Antonini, A. Novel formulations and modes of delivery of levodopa. *Mov. Disord.*, **2015**, 30(1), 114-120.
- [65] Rieck, M.; Schumacher-Schuh, A.F.; Atmann, V.; Callegari-Jacques, S.M.; Rieder, C.R.M.; Hutz, M.H. Association between DRD2 and DRD3 gene polymorphisms and gastrointestinal symptoms induced by levodopa therapy in Parkinson's disease. *Pharmacogenom. J.*, **2018**, 18(1), 196-200.

- [66] Müller, T.; Möhr, J.D. Efficacy of carbidopa-levodopa extended-release capsules (IPX066) in the treatment of Parkinson disease. *Expert Opin. Pharmacother.*, **2018**, *19*(18), 2063-2071.
- [67] Safe, S. Carbidopa: A selective Ah receptor modulator (SAhRM). *Biochem. J.*, **2017**, *474*(22), 3763-3765.
- [68] Antonini, A.; Moro, E.; Godeiro, C.; Reichmann, H. Medical and surgical management of advanced Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, **2018**, *33*(6), 900-908.
- [69] Shin, M.S.; Meong, H.Y.; An, D.I.; Lee, H.Y.; Sung, I.H. Treadmill exercise facilitates synaptic plasticity on dopaminergic neurons and fibers in the mouse model with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, **2016**, *621*, 28-33.
- [70] Kühn, J.; Haumesser, J.K.; Beck, M.H.; Altschüler, J.; Kühn, A.A.; Nikulin, V.V.; Riesen, C. Differential effects of levodopa and apomorphine on neuronal population oscillations in the cortico-basal ganglia loop circuit *in vivo* in experimental parkinsonism. *Exp. Neurol.*, **2017**, *298*(Pt A), 122-133.
- [71] Reichmann, H. Modern treatment in Parkinson's disease, a personal approach. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, **2016**, *123*(1), 73-80.
- [72] Pastor, P.; Tolosa, E. Cabergoline in the treatment of Parkinson's disease. *Neurologia*, **2003**, *18*(4), 202-209.
- [73] Gopinathan G, Horowski R, Suchy IH. Lisuride pharmacology and treatment of Parkinson's disease. In Calne DB (Ed.) *Drugs for the treatment of Parkinson's disease, Handbook of Experimental Pharmacology*, **1989**, *88*, 471-513.
- [74] Italiano, D.; Bianchini, E.; Ilardi, M.; Cilia, R.; Pezzoli, G.; Zanetini, R.; Vacca, L.; Stocchi, F.; Bramanti, P.; Ciurleo, R.; Di Lorenzo, G.; Polimeni, G.; de Luise, C.; Ross, D.; Rijnbeek, P.; Sturkenboom, M.; Trifirò, G. Effectiveness of risk minimization measures for cabergoline-induced cardiac valve fibrosis in clinical practice in Italy. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, **2015**, *122*(6), 799-808.
- [75] Pondal, M.; Teodoro, D.S.; Bermejo, F. Anticholinergic therapy and dementia in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol.*, **1996**, *243*(7), 543-545.
- [76] Porter, M.C.; Apprah-Kubf, L.S.; Chaudhuri, K.R. Treatment of Parkinson's disease and restless legs syndrome with cabergoline, a long-acting dopamine agonist. *Int. J. Clin. Pract.*, **2002**, *56*(6), 468-474.
- [77] Faddoul, L.; Chahine, B.; Haydar, S.; Abourida, S.; Hallit, S.; Raad, E. The effect of pramipexole extended release on the levodopa equivalent daily dose in Lebanese Parkinson diseased patients. *Pharm. Pract. (Granada)*, **2018**, *16*(4), 1220.
- [78] Pardeshi C.V.; Belgamwar, V.S. Ropinirole-dextran sulfate nanoplex for nasal administration against Parkinson's disease: *In silico* molecular modeling and *in vitro ex vivo* evaluation. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **2017**, *45*(3), 635-648.
- [79] Perez-Lloret, S.; Rey, M.V.; Ratti, P.L.; Rascol, O. Rotigotine transdermal patch for the treatment of Parkinson's Disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **2013**, *27*(1), 81-95.
- [80] van Wamelen, D.J.V.; Grigorioud, S.; Chaudhuri, K.R.; Odin, P. Continuous drug delivery aiming continuous dopaminergic stimulation in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.*, **2018**, *8*(suppl.1), S65-S72.
- [81] Santos, E.U.D.; Duarte, E.B.C.; Miranda, L.M.R.; Asano, A.G.C.; Asano, N.M.J.; Maia, M.M.D.; Souza, P.R.E. Pharmacogenetic profile and the occurrence of visual hallucinations in patients with sporadic Parkinson's disease. *J. Clin. Pharmacol.*, **2019**, *59*(7), 1006-1013.
- [82] Mallajosyula, J.K.; Deepinder K.; Shankar, J.C.; Subramanian, R.; Anand R.; Nicholls, D.G.; Di Monte, D.A.; Macarthur H.; Andersen, J.K. MAO-B Elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology. *PLoS One*, **2008**, *3*(2), e1616.
- [83] Liu, B.; Chaonan, L.; Zhang, J.; Liu, Y.; Sun, J.; Cheng, X.; Mao, W.; Ma, Y.; Li, S. Effects of eldepryl on glial cell proliferation and activation in the substantia nigra and striatum in a rat model of Parkinson's disease. *Neurol. Res.*, **2017**, *39*(5), 459-467.
- [84] Olanow, C.W.; Rascol, O.; Hauser, R.; Feigin, P.; Jankovic, J.; Lang, A.; Langston, W.; Melamed, E.; Poewe, W.; Stocchi, F.; Tolosa, E. A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, **2009**, *361*(13), 1268-1278.
- [85] Valldeoriola, F. Consenso de expertos españoles sobre el uso de la safinamida en la enfermedad de Parkinson. *Neurologia*. **2017**.
- [86] Bonifácio, M.J.; Torão, L.; Loureiro, A.I.; Palma, P.N.; Wright, L.C.; Soares-da-Silva, L. Pharmacological profile of opicapone, a third-generation nitrocatechol catechol-O-methyl transferase inhibitor, in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **2015**, *172*(7), 1739-1752.
- [87] Brooks, D.J.; Sagar, H. Entacapone is beneficial in both fluctuating and non-fluctuating patients with Parkinson's disease: A randomised, placebo controlled, double blind, six months study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, **2003**, *74*, 1071-1079.
- [88] Poór, M.; Zrínyi, Z.; Köszegi, T. Structure related effects of flavonoid aglycones on cell cycle progression of HepG2 cells: Metabolic activation of fisetin and quercetin by catechol-O methyltransferase (COMT). *Biomed. Pharmacother.*, **2016**, *83*, 998-1005.
- [89] Truong, D.D. Tolcapone: Review of its pharmacology and use as adjunctive therapy in patients with Parkinson's disease. *Clin. Interv. Aging*, **2009**, *4*, 109-113.
- [90] Fabbri, M.; Ferreira, J.J.; Lees, A.; Stocchi, F.; Poewe, W.; Tolosa, E.; Rascol, O. Opicapone for the treatment of Parkinson's disease: A review of a new licensed medicine. *Mov. Disord.*, **2018**, *33*(10), 1528-1539.
- [91] Devos, D.; Moreau, C.; Dujardin, K.; Cabantchik, L.; Defebvre, L.; Bordet, R. New pharmacological options for treating advanced Parkinson's disease. *Clin. Ther.*, **2013**, *35*(10), 1640-1652.
- [92] Bortolato, M.; Godar, S.C.; Alzghoul, L.; Zhang, J.; Darling, R.D.; Kimberly L. Simpson, K.L.; Bini, V.; Chen, K.; Wellman, C.L.; Lin, R.C.S.; Shih, J.C. Monoamine oxidase A and A/B knockout mice display autistic-like features. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **2013**, *16*(4), 869-888.
- [93] Mrad, M.L.; Zeller, M.; Hernandez, K.J.; Rzaigui, M.; Ben Nasr, C. Bis(adamantan-1-aminium) hydrogen phosphate fumaric acid sesquiosolvate. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online.*, **2012**, *68*(Pt 8), 2531-2532.
- [94] Perez-Lloret, S.; Rascol, O. Efficacy and safety of amantadine for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, **2018**, *125*(8), 1237-1250.
- [95] Kostelnik, A.; Cegan A.; Pohanka, M. Anti-Parkinson drug biperiden inhibits enzyme acetylcholinesterase. *Biomed. Res. Int.*, **2017**, *2017*, 1-5.
- [96] Downs, A.M.; Fan, X.; Donsante, C.; Jinnah, H.A.; Hess, E.J. Trihexyphenidyl rescues the deficit in dopamine neurotransmission in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol. Dis.*, **2019**, *125*, 115-122.

2.1 OBJETIVO GERAL

Planejar *in silico* e avaliar a toxicidade aguda *in vivo* de moléculas de origem natural com atividade inibitória de monoamina oxidase B para o desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Parkinson.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar as regiões farmacofóricas das substâncias naturais selecionados;
- b) Determinar o modo de interação entre as substâncias naturais selecionadas e a enzima monoamina oxidase B através do *docking* molecular;
- c) Predizer as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das substâncias naturais selecionadas;
- d) Propor análogos mais ativos da substância natural que apresentou resultados mais relevantes nas etapas anteriores;
- e) Predizer a atividade *in silico* os análogos propostos
- f) Avaliar a toxicidade aguda *in vivo*, em modelo animal Zebrafish, dos análogos propostos.

Artigo a ser submetido para revista ChemMedChem.

Planejamento *in silico* e avaliação de toxicidade aguda, *in vivo*, de análogos de chalconas com atividade biológica antiparkinsoniana

Bianca. L. B. Marino^A; Jaderson V. Ferreira^A; Brenda, L. Sánchez-Ortiz^B; Irlon M. Ferreira^C; José C. T. Carvalho^A; Carlos H. T. P. Silva^D; Lorane I. S. Hage-Melim,^A

[A] Bianca Liffey Brito Marino, Ms. Jaderson Vieira Ferreira, Dr. Lorane I. da S. Hage-Melim, <https://orcid.org/0000-0002-7851-7363>

Laboratory of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry (PharMedChem)

Federal University of Amapá, Rod. JK, Km 02, Macapá (Brazil)

E-mail: loranehage@gmail.com; lorane@unifap.br

[B] Brenda Lorena Sánchez-Ortiz, José Carlos Tavares Carvalho

Laboratory of Research Pharmaceutical

Federal University of Amapá, Rod. JK, Km 02, Macapá (Brazil)

E-mail: <http://lattes.cnpq.br/2169389039676582>

[C] Irlon Maciel Ferreira

Laboratory Biocatalysis and Biotransformation in Organic Chemistry

Federal University of Amapá, Rod. JK, Km 02, Macapá (Brazil)

E-mail: <http://lattes.cnpq.br/9897023410899133>

[D] Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

Laboratory Biocatalysis and Biotransformation in Organic Chemistry

University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Av do Café s/n, Centro, Ribeirão-SP (Brasil)

E-mail: <http://lattes.cnpq.br/6752825379349219>

Resumo: A doença de Parkinson (DP) é causada pela falta de dopamina, ocasionando um desequilíbrio nas regiões cognitivas e motoras do cérebro. Portanto, a busca por novos inibidores é importante para aumentar as possibilidades terapêuticas. Assim, as plantas medicinais são mais estudadas por apresentarem muitas substâncias com atividades biológicas variadas. Com a Química Medicinal, por meio de estudos *in silico*, é possível planejar moléculas com atividade definida, depois confirmar essa atividade *in vitro* e em testes *in vivo*. Neste estudo, o modelo animal utilizado foi o *Danio rerio* (peixe-zebra), devido às semelhanças de seu sistema nervoso central com o humano. Assim, o estudo teve como objetivo planejar *in silico* e avaliar a toxicidade aguda *in vivo* de moléculas com predição da atividade da MAO-B para o desenvolvimento de fármacos candidatos ao tratamento da DP. De acordo com os resultados obtidos *in silico*, foi possível identificar o Amburosideo A como um bioligante promissor a partir do qual foram obtidas os análogos PMC1, PMC2, PMC3, sendo o último testado em Peixe-zebra para teste de toxicidade aguda com resultado negativo, indicando que é um molécula promissora para tratar a doença de Parkinson.

Palavras-chave: Parkinson, plantas medicinais, química medicinal, peixe-zebra.

Introdução

O diagnóstico das doenças neurodegenerativas está aumentando gradualmente na população mundial, devido ao crescente número de pessoas na faixa etária idosa. A doença neurodegenerativa mais diagnosticada é a Doença de Alzheimer, e a segunda mais comum é a Doença de Parkinson (DP), em que acomete pessoas de 55 a 60 anos^[1]. E no Brasil, houve um aumento na frequência de doenças

neurodegenerativas diagnosticadas em indivíduos com idade acima dos 60 anos, incluindo a Doença de Parkinson. A DP é uma doença neurodegenerativa causada pela morte de neurônios dopaminérgicos os quais são responsáveis pela síntese do neurotransmissor dopamina (DA), afetando as regiões cognitivas e motoras do cérebro^[2]. A causa da degradação dos neurônios ainda não foi descoberta, porém surgiram algumas hipóteses para explicar a fisiopatologia da DP, sendo uma dessas hipóteses o estresse oxidativo provocado pela monoamina oxidase B (MAO-B) ao degradar a dopamina liberando radicais livres, além de diminuir a quantidade do neurotransmissor na fenda sináptica^[3, 4].

Tendo em vista a relação da MAO-B com a fisiopatologia da DP, o foco de muitos estudos está sendo os inibidores dessa enzima com o objetivo de diminuir sua atividade e aumentar a DA na fenda sináptica, além de reduzir a produção de radicais livres. Porém, essa classe de medicamentos não é muito utilizada no tratamento devido aos seus efeitos colaterais, e isto causa a falta de adesão dos pacientes ao tratamento^[5, 6]. Dessa forma, há um crescente número de estudos com plantas medicinais, considerando sua variedade de substâncias naturais, em que podem auxiliar no desenvolvimento de fármacos com melhores atividades, e, também, há uma maior adesão ao tratamento pela população brasileira quando o medicamento é de origem natural. Entre as plantas medicinais que são encontradas na flora brasileira, tem-se a *Passiflora incarnata* e *Amburana cearensis* com potencial efeito antioxidante e neuroprotetor, das quais podem ser utilizadas as substâncias naturais para planejar fármacos antiparkinsonianos^[7, 8].

Desde o século XVIII, a descoberta de novos fármacos era realizada de forma aleatória baseada em conhecimentos tradicionais, observações empíricas da utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças. Apesar de não analisarem de forma correta, foi possível identificar muitas moléculas com atividade farmacológica importante. No decorrer do tempo, as análises foram bastante aprimoradas, utilizando o processo de triagem de várias moléculas em ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*, surgindo uma nova área na descoberta de fármacos chamada Química Medicinal, que integra os ensaios *in vitro* e *in vivo* com os estudos *in silico* com o advento dos computadores, que utiliza ferramentas computacionais para simular vários testes, como propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, predição de atividade e viabilidade sintética, entre outros^[9].

A escolha do modelo animal no ensaio *in vivo* depende do objetivo do estudo e a patologia a ser estudada. No caso da DP, desde a década de 80, começou a utilizar o peixe *Danio rerio*, popularmente conhecido como Zebrafish, pois esse peixe possui muitas características importantes para a realização de vários estudos, como por exemplo: crescimento rápido facilitando estudos de toxicidade reprodutiva, e menor custo financeiro tanto para compra quanto para a manutenção do ambiente^[10]. Além disso, os peixes Zebrafish apresentam características anatômicas e funcionais semelhantes às dos mamíferos, como o cérebro onde tem-se os neurônios dopaminérgicos, células de Purkinje do cerebelo e os neurônios motores. Alguns estudos sugeriram que a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) é metabolizada em embriões e larvas de Zebrafish por uma monoamina oxidase semelhante à MAO-B de mamífero^[11].

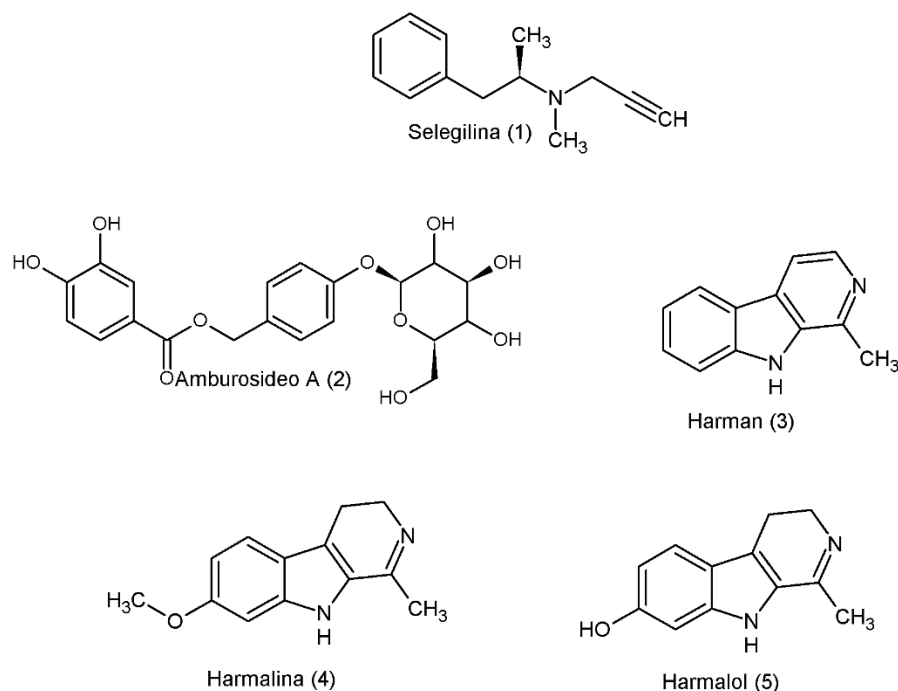
De acordo com os dados obtidos na literatura científica, este estudo teve como objetivo realizar o planejamento de candidatos a fármaco inibidores da MAO-B a partir do protótipo de origem natural, através da Química Medicinal, utilizando planejamento *in silico*, síntese dos análogos e avaliação da toxicidade *in vivo*.

Resultados e discussão

Pesquisa bibliográfica das substâncias naturais

Na Figura 1, observam-se o medicamento, utilizado como padrão, e as substâncias naturais descritas na literatura e utilizadas nesse estudo, respectivamente: Selegilina (1), Amburosideo A (2), Harman (3), Harmalina (4), Harmalol (5), que foram desenhadas no programa ChemSketch 12.0^[3, 4, 7, 20, 21, 22].

Figura 1 - Estrutura química da Selegilina (1), e das substâncias naturais Amburosideo A (2), Harman (3), Harmalina (4), Harmalol (5).



A Selegilina foi o primeiro inibidor da MAO-B a ser descoberto. A molécula foi sintetizada por Zoltán Ecseri na Chinoín Pharmaceuticals (Budapeste, Hungria) em 1962, e seu efeito inibitório seletivo da selegilina em uma das isoformas da MAO foi identificado por Knoll e Magyar (1972). Desde então, esse fármaco é utilizado para o tratamento da DP, pois é um inibidor irreversível que em altas doses apresenta atividade antidepressiva, possui, também, ação neuroprotetora frente à MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) e seus efeitos simpatomiméticos estão relacionados a metabólitos de metanfetamina. Porém, devido aos seus efeitos adversos como insônia, vertigens, cefaléias, bradicinesia entre outros, os pacientes abandonam o tratamento [4, 23, 6].

Das várias plantas relatadas na literatura, encontraram-se duas plantas pertencentes a flora brasileira *Amburana cearenses* que é nativa do nordeste brasileiro e *Passiflora incarnata* nativa da Amazônia, com o intuito de valorizar as plantas da flora nacional, no qual foram relatados estudos experimentais com atividade neuroprotetora em modelos de DP induzida [8, 20, 24].

A. cearensis (sin. *Torresea cearensis*) é uma planta pertencente à família Leguminosea, popularmente conhecida por diversas designações, como imburana de cheiro, cerejeira e cumaru [24]. Em estudo de revisão de plantas brasileira com atividade inflamatória, foram relatadas as substâncias naturais isokaempferida (12,5, 25 e 50 mg/kg) e amburosideo A (25 e 50 mg /kg), isoladas das conchas de *A. cearensis*, com atividade anti-inflamatória considerável, pois inibiram a migração de neutrófilos e leucócitos e a produção de TNF- α e prostaglandinas E2 [25]. Em outro estudo, os glicosídeos fenólicos encontrados na *A. cearensis*, Amburosideo A e B tiveram sua atividade biológica avaliada em culturas de células expostas à neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), um derivado hidroxilado da dopamina que possivelmente é formado endogenamente em pacientes com a DP, porém, somente o amburosideo A apresentou neuroproteção [7, 20].

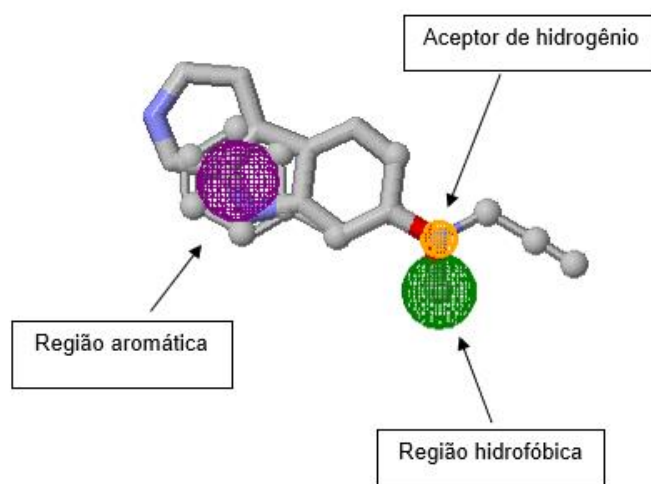
P. incarnata conhecida popularmente como maracujá, palavra de origem indígena (tupi), é uma planta herbácea, trepadeira, oriunda do norte da América do Sul. Os principais constituintes das folhas de *P. incarnata* são flavonoides (0,25%), tais como vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, apigenina e kampferol. Alcaloides com base em viz sistema anel β -carbolina, harman, harmina, harmalina e harmalol são referidos como sendo compostos antiparkinsonianos eficazes [22]. Também foram avaliados os flavonoides com potencial atividade antioxidante como antiparkinsoniano e para o melhoramento da memória no tratamento da Doença de Alzheimer em que os resultados apresentaram diminuição significativa de radicais livres [6]. Outros estudos com a *P. incarnata*, com o extrato aquoso das folhas secas, avaliaram-se os efeitos do extrato em camundongos albinos que foram induzidos experimentalmente por neurolépticos para desenvolverem a catalepsia de DP, pois este é um modelo animal usado para o rastreio de fármacos e obtiveram resultados positivos quanto a atividade [26].

Derivação do padrão farmacofórico

Farmacóforo é o conjunto de características eletrônicas e estéricas que identifica um ou mais grupos funcionais ou subunidades estruturais, necessários ao melhor reconhecimento molecular pelo receptor e, portanto, para o efeito farmacológico desejado, estes são classificados por score^[27]. A Selegilina e as 4 substâncias de origem natural foram submetidos ao webservidor PharmaGist obtendo-se o farmacóforo. A Figura 2 apresenta o resultado do farmacóforo tendo a Selegilina como molécula pivô, porém no agrupamento teve somente o produto natural Harmalina com o score 4,825 apresentando as características espaciais: um grupo aceitador de ligação de hidrogênio (esfera amarela), um grupo hidrofóbico (esfera verde) e uma região aromática (esfera roxa), indicando que provavelmente a Harmalina possui as mesmas regiões essenciais que a Selegilina.

Hagenow e colaboradores (2020) identificaram, para o inibidor da MAO-B, o padrão farmacofórico com uma região hidrofóbica, duas regiões aceitadoras e uma região aromática^[28]. Enquanto que Mathew e colaboradores (2017), encontram um modelo com um aceitador de hidrogênio, um hidrofóbico e duas regiões aromáticas. No presente estudo, a região aromática, aceitadora de hidrogênio e hidrofóbica assemelharam-se aos estudos anteriores^[29].

Figura 2 - Derivação do grupamento farmacofórico da Selegilina e as 4 substâncias naturais.

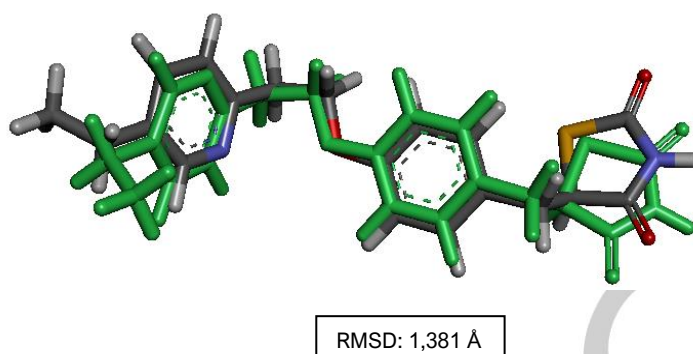


Estudo de *docking* molecular

Para o estudo da simulação do *docking* considerou-se, como ligante, o medicamento padrão Selegilina (1) e as substâncias naturais Amburosideo A (2), Harman (3), Harmalina (4), Harmalol (5) e, como enzima, a MAO-B. Para isso, primeiramente, foi feita a seleção a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB) da estrutura cristalográfica da MAO-B depositada na forma de complexo sob o código 4A79, com a resolução de 1,89 Å. O programa utilizado foi o GOLD 5.4 que utiliza o algoritmo genético para fins de experimentos de *docking* flexível de ligantes dentro de sítios de ligação de proteínas^[15]. E este foi utilizado para identificar o sítio de ligação da MAO- B para que seja feita a simulação da interação entre os ligantes e a enzima.

A validação do programa para simulação do *docking* consiste na replicação do resultado experimental das posições dos átomos do ligante em relação ao sítio ativo da enzima, adquirido do complexo cristalográfico, e através do programa GOLD 5.4 foram realizados vários testes de acoplamentos na tentativa de obter as mesmas posições dos átomos do resultado experimental. O método mais utilizado para analisar se o programa conseguiu reproduzir o resultado experimental é o cálculo do Desvio Quadrático Médio (RMSD) na qual estudos anteriores mostraram que resultados menores de 2 Å possuem alta taxa de sucesso para a replicação do resultado experimental^[30]. Por meio do programa Discovery Studio Vizualizer^[21] foi possível visualizar o valor de RMSD de 1,381 Å comparado com a posição do ligante oriundo do resultado experimental do complexo 4A79, mostrado na Figura 3.

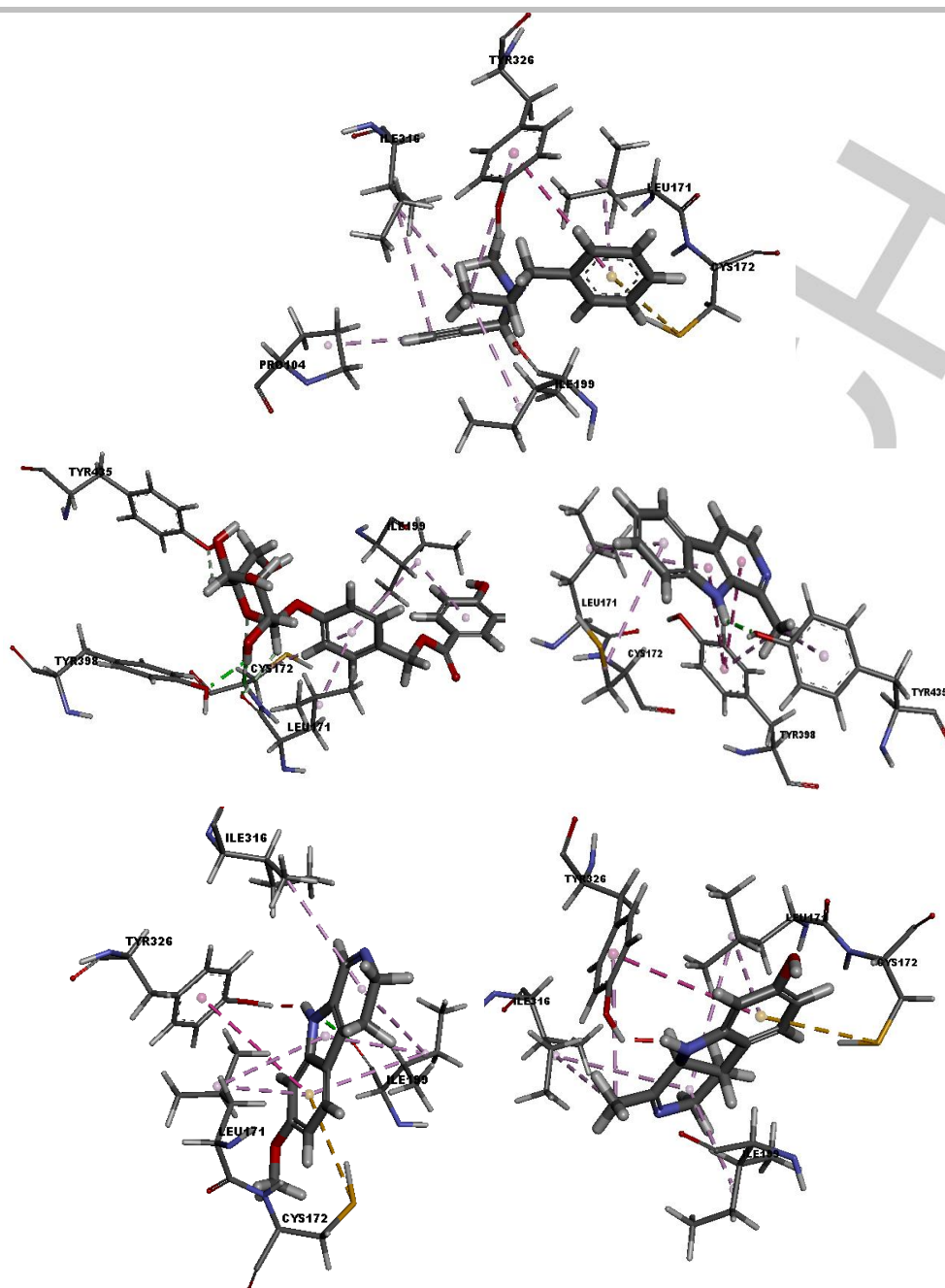
Figura 3 - Resultado da simulação de *docking* com o menor RMSD para a validação do complexo 4A79 (molécula cinza = complexo, molécula verde = rmelhor conformação do docking).



As interações hidrofóbicas ocorrem entre regiões apolares como anéis aromáticos e metilas. As ligações de hidrogênio convencionais são caracterizadas quando uma região aceitadora de próton interage com uma região doadora de próton devido à diferença de eletronegatividade. Este tipo de acoplamento ocorre entre átomos eletronegativos tais como oxigênio e nitrogênio^[31]. As ligações de hidrogênio com a distância abaixo ou igual a 3 Å são relevantes para afirmar que há interação, enquanto as ligações hidrofóbicas possuem distância abaixo ou igual a 5 Å para que haja interação entre os aminoácidos e a produto natural ligante^[32].

A Figura 4 mostra as possíveis interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo que foram selecionados conforme descrito na literatura: TYR398, TYR435, PHE343, LEU171, TYR326, ILE316, PRO104, PRO104, ILE199, LEU171, CYS172, TRP119^[33] e o medicamento padrão, Selegilina, juntamente com as substâncias naturais estudadas. As análises demonstraram que as possíveis ligações foram na maioria interações hidrofóbicas, e tiveram dois aminoácidos em comum LEU171 e CYS172, e todas as moléculas estudadas tiveram interação com mais de 3 aminoácidos entre os 12 do sítio ativo.

Figura 4 – Representação da simulação de *docking* molecular dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo da MAO-B e as substâncias naturais estudadas: Selegilina (1), Amburosideo A (2), Harman (3), Harmalina (4) e Harmalol (5).



Na Tabela 1 são mostrados os resultados da simulação de *docking* com as possíveis interações para a molécula padrão Selegilina (1), e as substâncias de origem natural Amburosideo A (2), Harman (3), Harmalina (4) e Harmalol (5).

A simulação de *docking* entre a Selegilina e os resíduos de aminoácidos da MAO-B apresentou 8 interações em 6 resíduos de aminoácidos diferentes do sítio ativo: CYS172, TYR326, PRO104, ILE316, ILE199 e LEU171. Todas as interações foram hidrofóbicas, com exceção da interação com o resíduo de aminoácido CYS172 no qual obteve-se uma interação de van der Waals entre o átomo de enxofre do aminoácido CYS172 e a ressonância do anel aromático da molécula com distância de 4,73 Å. Com o resíduo de aminoácido TYR326, observaram-se duas interações hidrofóbicas, uma entre a ressonância do anel aromático do aminoácido e o carbono do radical metila da molécula, e a outra entre os anéis aromáticos tanto do aminoácido quanto da molécula, com distâncias 5,28Å e 5,46Å, respectivamente. Com o resíduo de aminoácido PRO104 obteve-se uma interação hidrofóbica entre um grupo alquil do aminoácido e o átomo de hidrogênio da molécula com distância de 3,99 Å. Com o resíduo de aminoácido ILE316, observaram-se duas interações hidrofóbicas, entre um grupo alquil do aminoácido e o carbono do radical metila, e outra interação entre o grupo alquil do resíduo de aminoácido e o carbono terciário da Selegilina, com distâncias de 4,84 Å e 4,64 Å, respectivamente. Com o resíduo de aminoácido ILE199, obteve-se uma interação hidrofóbica entre um grupo alquil do aminoácido e o carbono do radical metila da molécula com

distância de 4,22 Å. Com o resíduo de aminoácido LEU171, obteve-se uma ligação hidrofóbica entre um grupo alquil do aminoácido e o anel aromático da molécula com distância de 4,24 Å, com o score 64.54.

A simulação entre a Amburosideo A e os resíduos de aminoácidos da MAO-B apresentou 7 ligações em 5 aminoácidos diferentes: LEU171, CYS172, TYR398, TYR435 e ILE199. A maioria das interações é do tipo hidrofóbica (4), e também ocorreram três interações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio (H) e oxigênio (O). Com o resíduo de aminoácido LEU171, obteve-se uma interação do tipo hidrofóbica entre o grupo alquil do resíduo de aminoácido e o anel aromático da substância natural com distância de 3,97 Å. O resíduo de aminoácido CYS172 apresentou duas interações, uma do tipo interação de hidrogênio entre o H do aminoácido e O da substância natural com distância de 2,65 Å, e a outra do tipo hidrofóbica entre um grupo alquil do resíduo de aminoácido e o anel aromático da substância natural, com distância de 5,06 Å. Com o resíduo de aminoácido TYR398, obteve-se uma interação de hidrogênio entre os átomos de O do resíduo de aminoácido e o H do Amburosideo A com distância de 2,11 Å. O resíduo de aminoácido TYR435 apresentou uma interação de hidrogênio entre o O da hidroxila do aminoácido e o H do Amburosideo A com distância de 2,51 Å. O resíduo de aminoácido ILE199 apresentou duas interações hidrofóbicas, entre grupos alquil do resíduo de aminoácido e o anel aromático do Amburosideo A, com distâncias de 3,83 Å e 4,89 Å, com o score de 105.20.

Na simulação entre a Harmam e os resíduos de aminoácidos da MAO-B, foram observadas 7 interações em 4 aminoácidos diferentes: TYR435, TYR398, LEU171 e CYS172. A maioria das interações é do tipo hidrofóbicas e apenas uma do tipo interação de hidrogênio. Com o resíduo de aminoácido TYR435, observaram-se duas interações, uma do tipo interação de hidrogênio entre o O do resíduo de aminoácido e o H do Harmam, e outra do tipo hidrofóbica entre o anel aromático do resíduo de aminoácido e o grupo alquil, com distâncias de 2,09 Å e 3,84 Å, respectivamente. Com o resíduo de aminoácido TYR398, observaram-se três interações do tipo hidrofóbica, uma entre os anéis aromáticos do resíduo de aminoácido e da Harmam, outra entre o anel aromático do resíduo de aminoácido e o anel pirrolidínico da Harmam, e uma entre o anel aromático do resíduo de aminoácido e o grupo alquil do Harmam com distâncias 4,51 Å, 5,36 Å, 4,06 Å, respectivamente. O resíduo de aminoácido LEU171 apresentou uma interação do tipo hidrofóbica entre o grupo alquil do resíduo de aminoácido e o anel aromático do Harmam com distância de 4,52 Å. O aminoácido CYS172 apresentou uma interação hidrofóbica entre o grupo alquil do resíduo de aminoácido e o anel aromático do Harmam com distância 4,83 Å, com score de 64.01.

Na simulação entre a Harmalina e os resíduos de aminoácidos da MAO-B, observaram-se 8 interações em 5 aminoácidos diferentes: ILE199, CYS172, TYR326, ILE316 e LEU171. A maioria das ligações foi do tipo hidrofóbica, sendo somente uma do tipo interação de hidrogênio. Com o resíduo de aminoácido ILE199, obteve-se uma interação de hidrogênio entre os átomos O do resíduo de aminoácido e H da Harmalina, e três interações do tipo hidrofóbica sendo uma entre o grupo alquil do resíduo de aminoácido, e os três anéis aromáticos do produto natural, com distâncias de 3,08 Å, 4,79 Å, 4,86 Å e 4,22 Å, respectivamente. Com o resíduo de aminoácido CYS172, obteve-se uma interação entre o átomo de enxofre (S) do aminoácido e o anel aromático da Harmalina com distância de 4,76 Å. Com o resíduo de aminoácido TYR326, obteve-se uma interação do tipo hidrofóbica entre os anéis aromáticos do resíduo de aminoácido e o grupo alquil da Harmalina com distância de 3,36 Å. O resíduo de aminoácido ILE316 apresentou uma interação hidrofóbica entre grupos alquil do resíduo de aminoácido e a piridina da Harmalina com distância 4,87 Å. O resíduo de aminoácido LEU171 apresentou duas interações do tipo hidrofóbicas, uma entre o grupo alquil do aminoácido e o anel aromático da Harmalina com distância de 4,21 Å, com score 57.32.

Na simulação entre o Harmalol e os resíduos de aminoácidos da MAO-B, 7 interações em 5 aminoácidos diferentes foram observadas. Todas as interações são do tipo hidrofóbicas. Com o aminoácido CYS172, obteve-se uma interação entre o enxofre (S) do resíduo de aminoácido e o anel aromático do Harmalol com distância de 4,88 Å. Com o resíduo de aminoácido TYR326 observaram-se duas interações, uma entre os anéis aromáticos do resíduo de aminoácido, com o grupo alquil do Harmalol, com distâncias de 5,34 Å e 4,92 Å, respectivamente. Com o resíduo de aminoácido LEU171, obteve-se uma interação entre o grupo alquil do resíduo de aminoácido e o anel aromático do Harmalol com distância de 4,19 Å. O resíduo de aminoácido ILE199 apresentou uma interação entre os grupos alquil do aminoácido e o grupo piridina do Harmalol com distância de 4,20 Å. O resíduo de aminoácido ILE316 apresentou duas interações entre os grupos alquil do resíduo de aminoácido e anel aromático do Harmalol com distâncias de 5,28 Å e 4,72 Å, com score de 57.50.

Contudo, a molécula padrão Selegilina é um medicamento inibidor irreversível da MAO-B utilizado no tratamento da DP, essa característica de irreversibilidade está associada aos efeitos adversos dos inibidores devido inativar, totalmente ou parcialmente, a

enzima por longo período de tempo, em alguns casos ocasionando a destruição de alguns grupos funcionais do sítio ativo, no qual está relacionado com as ligações do tipo covalente, e nesse caso supõe-se que a ligação covalente está entre o átomo de enxofre do resíduo CYS172 e a molécula, além de ser a única que apresentou interação fraca com o resíduo de aminoácido PRO104 porém importante para conformação e estabilização da interação, com isso supõe-se que essas duas interações podem ser a causa dos efeitos colaterais desse medicamento. Para os resultados do docking, a Selegilina apresentou 8 interações em seis aminoácidos diferentes sendo CYS172, TYR326, PRO104, ILE316, ILE199, LEU171, e o resultado mais próximo da molécula padrão foi do produto natural Harmalina por apresentar 8 interações com os mesmos aminoácidos os quais a Selegilina também interagiu, com exceção do PRO104. Portanto, pode-se deduzir que a Harmalina possui maior probabilidade dentre as quatro substâncias de origem natural de apresentar atividade inibitória da enzima MAO-B, da mesma forma que a Selegilina, indicando inibição irreversível. No entanto, a substância natural Amburosídeo A apresentou 7 possíveis interações em que 3 foram com aminoácidos iguais a qual Selegilina interagiu, e 2 aminoácidos diferentes pertencentes ao sítio ativo, e o seu score foi mais alto (105,20) em relação as outras moléculas, indicando que provavelmente a ação inibitória da Amburosídeo A é diferente da Selegilina, podendo ser reversível, característica essa almejada no planejamento de fármacos com ação inibitória da MAO-B.

O estudo de Dhiman, Malik e Khatkar^[34] apresentou o *docking* da piperina, alcalóide da *Piper nigrum*, em que demonstrou possíveis ligações com TYR326, TYR398, PHE168, TRP119, PHE103, ILE199, CYS172, PHE343 E TYR188. Ressaltando que as substâncias naturais do presente estudo também apresentaram interações com esses resíduos de aminoácidos, sendo em destaque a Amburosídeo A em que dos cinco resíduos de aminoácidos que interagiu, três estão presentes no estudo de Dhiman, Malik e Khatkar.

Hagenow e colaboradores^[28] realizaram o *docking* de dois compostos para a MAO-A e MAO-B. Com isso, foi observado que os compostos tiveram interação com os resíduos de aminoácidos LEU164, PHE168, PRO102, GLN206 e CYS172, sendo que este último também interage com os produtos naturais estudados.

Tabela 1 - Simulação de *docking* entre as moléculas estudadas e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima MAO-B.

Moléculas	Aminoácidos do Sítio Ativo	Átomos envolvidos	Tipos de interação	Distância (Å)	Score
Selegilina	PRO 104	Alkyl - H	Hidrofóbica	3,99	64,54
	LEU171	1343 C - Ph	Hidrofóbica	4,24	
	CYS172	S - Ph	Van der Waals	4,73	
	ILE199	Alkyl - C	Hidrofóbica	4,22	
	ILE 316	Alkyl - C	Hidrofóbica	4,64	
		Alkyl - C	Hidrofóbica	4,84	
	TYR 326	Ph - C	Hidrofóbica	5,28	
		Ph - Ph	Hidrofóbica	5,46	
Amburosídeo A	LEU 171	1343 C - Ph	Hidrofóbica	3,97	105,20
	CYS 172	H - O	Interação de hidrogênio	2,65	
		S - Ph	Hidrofóbica	5,06	
	ILE 199	Alkyl - Ph	Hidrofóbica	3,83	
		Alkyl - Ph	Hidrofóbica	4,89	
	TYR 398	O - H	Interação de hidrogênio	2,11	
	TYR 435	OH - H	Interação de hidrogênio	2,51	
Harman	LEU 171	C1343 – Ph	Hidrofóbica	4,52	64,01
	CYS 172	S – Ph	Hidrofóbica	4,83	

Harmalina	TYR 398	Ph – Ph	Hidrofóbica	4,51	57,32
		Ph – Pirrol	Hidrofóbica	5,36	
		Ph – C14	Hidrofóbica	4,06	
	TYR 435	Ph – C14	Hidrofóbica	3,84	
		O – H	Interação de hidrogênio	2,09	
	LEU 171	C1343 – Ph	Hidrofóbica	4,21	
	CYS 172	S - Ph	Hidrofóbica	4,76	
	ILE 199	O - H	Interação de hidrogênio	3,08	
		Alkyl – C11	Hidrofóbica	4,79	
		Alkyl - Ph	Hidrofóbica	4,86	
		Alkyl - Ph	Hidrofóbica	4,22	
	ILE 316	Alkyl – C11	Hidrofóbica	4,87	
	TYR 326	Ph - Ph	Hidrofóbica	3,36	
Harmalol	LEU 171	C1343 – Ph	Hidrofóbica	4,19	57,50
	CYS 172	S – Ph	Hidrofóbica	4,88	
	ILE 199	Alkyl – C11	Hidrofóbica	4,20	
	ILE 316	Alkyl – C11	Hidrofóbica	5,28	
		Alkyl – C15	Hidrofóbica	4,72	
	TYR 326	Ph – Ph	Hidrofóbica	5,34	
		Ph – C15	Hidrofóbica	4,92	

Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) e toxicológicas

Predição de propriedades farmacocinéticas

Os modelos *in silico* de propriedades ADME, em comparação com os ensaios experimentais tradicionais, possuem uma aplicabilidade maior para atender a enorme demanda gerada na triagem em larga escala de novas moléculas. Além disso, os ensaios *in vitro* e *in vivo* apresentam desvantagens que limitam o seu uso em larga escala: são complexos e dispendiosos em termos de materiais, infraestrutura e pessoal qualificado. Por tanto, o estudo *in silico* é utilizado com ferramenta complementar na pesquisa, sendo mais utilizado na etapa de triagem [35, 36].

Por essas razões, há grande interesse da indústria na geração de modelos de ADME *in silico* que possam rapidamente auxiliar na seleção de moléculas promissoras e guiar a eliminação de compostos com perfil farmacocinético inadequado. Por outro lado, a integração de modelos de ADME (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*) parece ser um caminho essencial a ser seguido em todos os estágios do processo de descoberta de fármacos. Os resultados da predição ADME desse estudo são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades farmacocinéticas da Selegilina (1) e das substâncias naturais: Amburoside A (2), Harman (3), Harmalina (4) e Harmalol (5).

Moléculas	Absorção				Distribuição		
	AOH (%)	Doador de H	Aceitador de H	LogP	pCaco-2 (nm/sec)	pMDCK (nm/sec)	LogBB (C _{cerebral} /C _{sangue})
1	100	1	1	6,41	9091,5	5376,77	0.291

2	28,757	6	10	-2,51	10,649	3,648	-3,76
3	100	1	1	-0,96	4456,5	2487,91	-0,725
4	100	2	1	-2,08	3375,0	1842,24	-3,3
5	78,236	3	1	-0,45	336,8	168,814	-0,051

Para estimar a Absorção Oral Humana (HOA), o software QikProp prediz através do número de violações da Regra dos Cinco de Lipinski (RO5) e da porcentagem de HOA. A análise da RO5 é feita pelo número de violações dessa regra, sendo permitido apenas uma violação para os seguintes parâmetros para ser considerada uma molécula com boa biodisponibilidade pela via oral: menor que 5 doadores de hidrogênio, menor que 10 aceptadores de hidrogênio, peso molecular menor que 500 daltons e LogP menor que 5^[37]. Todas as moléculas em estudo, incluindo a pivô, mostraram zero violações em relação ao RO5, com exceção da Amburosídeo A que apresentou, apenas uma violação, 6 grupos doadores de ligação de hidrogênio, porém, continua tem um resultado satisfatório para a absorção oral. Enquanto que para o resultado de porcentagem, em que se considera > 80% alta absorção, 25–80% médio e <25% baixa absorção, as substâncias naturais apresentaram entre média e alta absorção. Portanto, tanto a Selegilina (molécula padrão) quanto as substâncias de origem natural apresentam resultados satisfatórios das propriedades físico-químicas para serem considerados bons fármacos para administração por via oral.

As células Caco-2 são úteis para aferir parâmetros de permeabilidade celular *in vitro*, um importante teste para avaliar a absorção intestinal de drogas. Além disso, a permeabilidade celular *in vitro* é frequentemente determinada também com células de rim canino Madin-Darby (MDCK), que têm um tempo de crescimento mais curto do que as células Caco-2. Os valores acima de 500 nm/sec para ambas as propriedades são considerados ideais. Para o parâmetro de permeabilidade em células Caco-2, as moléculas estudadas apresentaram resultados acima de 500 nm/sec, com exceção de Amburosídeo A e Harmalol que apresentaram valores abaixo de 500 nm/sec, enquanto que as moléculas que apresentaram resultados acima de 500 nm/sec foram Harmam (3) e Harmalina (4), indicando que provavelmente a maioria serão bem absorvidas no organismo. Para as células MDCK, a maioria das moléculas estudadas também apresentaram resultados satisfatórios com maior evidência para Harmam (3), Harmalina (4) e Harmalol (5) (Tabela 2).

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura complexa que consiste em elementos celulares e uma matriz extracelular. Ela desempenha um papel fundamental na determinação dos tipos de moléculas que podem atuar seletivamente no SNC, portanto, esse é um dos parâmetros mais importantes para esse estudo, tendo em vista que as moléculas estudadas e os análogos propostos devem ter ação no SNC, ou seja, apresentar boa permeabilidade na barreira hematoencefálica. O intervalo que indica possibilidade de ultrapassar essa barreira é de -3,0 e 1,2. E para esse parâmetro, as moléculas estudadas apresentaram boa permeabilidade, ressaltando que as substâncias naturais Harmam (3) e Harmalol (5) apresentaram melhores resultados de LogBB; Tabela 2).

Dhiman, Malik e Khatkar^[34] realizaram a predição ADMET no programa QikProp dos compostos derivados do alcaloide piperina que possuem potencial atividade inibitória para MAO. Nesse estudo, as substâncias naturais apresentaram entre médio e bom resultado para os parâmetros analisados, e nenhuma apresentou mais de uma violação da RO5 de Lipinski, com o resultado de doador de hidrogênio entre 0 e 1, aceptador de hidrogênio 3 e 7, LogP entre 2,15 e 5,445, MDCK entre 234,985 e 4525,13, Caco-2 entre 708,548 e 4427,72, e por fim o LogBB entre 0,118 e 1,874, ao comparar esses resultados com os desse estudo pode-se perceber que ambos violaram ao menos uma regra de Lipinski e resultado semelhantes para absorção e distribuição¹. Jiang e colaboradores^[38] produziram um estudo farmacocinético da Harmam e Harmalina *in vitro* e *in vivo* utilizando o modelo animal rato, com administração intravenosa, as substâncias naturais foram detectadas no estriado 300 minutos após administração, indicado que possuem boa permeabilidade da barreira hematoencefálica, confirmando o resultado *in silico* obtido no presente estudo.

De acordo com os dois estudos citados anteriormente, as substâncias naturais com atividade inibitória para MAO-B possuem resultados satisfatórios para serem considerados bons nas propriedades de absorção e distribuição, para continuação da pesquisa. Apesar da substância natural Amburosídeo A ter apresentado resultados não tão satisfatórios, a mesma pode ser modificada baseado-se no farmacóforo e *docking* molecular, destacando o resultado obtido para esse último parâmetro, para melhorar suas características farmacocinéticas, pois seus resultados *in vitro* foram bastante satisfatórios nos estudo de Ribeiro et al. (2018) e Almeida (2010), indicando que tem potencial atividade^[7, 25].

No planejamento e desenvolvimento de novos fármacos é muito importante o estudo das propriedades toxicológicas, pois a relação entre os danos e a eficácia é o fator da escolha de um medicamento para um determinado tratamento^[17].

O estudo das propriedades mutagênicas e carcinogênicas de moléculas é realizado em animais para obter resultados que provavelmente teriam em humanos. Porém, o custo da pesquisa das propriedades toxicológicas é bastante alto quando o estudo envolve várias moléculas, com isso surgem novas ferramentas e metodologias para a predição dessas propriedades^[39].

Como exemplo, o software DEREK, que contém um subconjunto de cerca de 50 regras que descrevem subestruturas toxicofóricas responsáveis, por exemplo, pela sensibilização da pele^[40] e faz esta predição considerando a presença de Halogenetos de alquila, aldeídos, compostos α , β insaturados, aminas aromáticas, Fenóis, Hidroquinonas, Isotiazolinonas, Alquil sulfonados e grupos nitro aromáticos nas moléculas teste^[41]. Constantemente estão sendo feitas melhorias para alertas e incluídas predições, como, alertas para 1,2-dicetonas e isotiazolinonas melhorando a definição do grupamento toxicofórico^[42].

Na predição das propriedades toxicológicas, somente o Amburosideo A (2) apresentou uma ação tóxica de alterar o cromossomo responsável pelo raciocínio humano indicando o grupo catecol como o grupamento toxicofórico, esse grupo não apresentou interação no docking molecular e também não faz parte do farmacóforo, por tanto, pode ser modificado para não apresentar mais toxicidade. E nenhuma substância natural apresentou alertas acerca da Genotoxicidade, Mutagenicidade e Carcinogenicidade, irritação, efeitos reprodutivos e neurotoxicidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Propriedades toxicológicas da Selegilina (1) e das substâncias naturais: Amburosideo A (2), Harmalina (3), Harmam (4), Harmalol (5).

Moléculas	Carcinogenicidade humana Alert 1 name	Mutagenicidade no raciocínio de bactérias <i>in vitro</i>	Mutagenicidade <i>in vitro</i> Raciocínio de Salmonella typhimurium	Cromossomo danifica o raciocínio humano <i>in vitro</i>
1	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta
2	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Catechol
3	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta
4	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta
5	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta	Ausência de alerta

Matew e colaboradores (2017) realizaram estudos *in vitro* de toxicidade com chalconas que tinham pontecial atividade inibitória da MAO. Os resultados mostraram que a maioria das chalconas não apresentaram toxicidade para as células hepáticas a 1 μ M. Ao aumentar a concentração para 5 μ M, alguns compostos exibiram toxicidade moderada^[29].

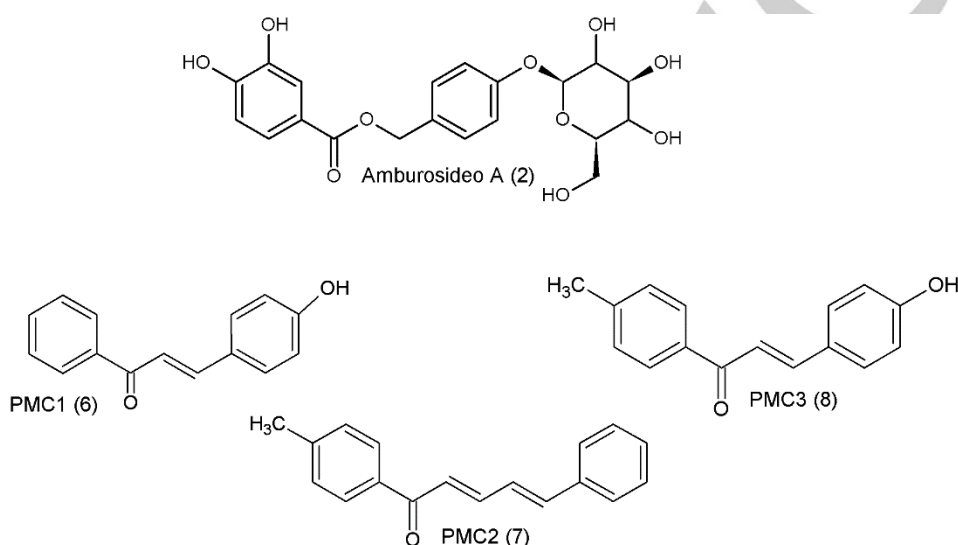
Is e colaboradores (2018) apresentaram um estudo com inibidores da MAO em que foram avaliadas as propriedades toxicológicas *in silico*, em que as duas moléculas as quais foram submetidas a 26 modelos QSAR de toxicidade diferentes, tais como mutagenicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade, anemia, genototoxicidade, hepatotoxicidade, necrose hepática e neurotoxicidade, apresentaram resultados de baixa probabilidade e/ou negativos para os modelos QSAR, indicando que eles provavelmente não são tóxicos^[43].

Com os resultados de toxicidade *in silico* das substâncias naturais, pode-se deduzir que a probabilidade dessas substâncias serem tóxicas são mínimas, principalmente por terem estudos *in silico* de inibidores da MAO-B em que a maioria das moléculas apresentaram nenhuma ou moderada toxicidade, confirmando o estudo realizado nessa pesquisa.

Modificações estruturais, predição de atividade e viabilidade sintética

Primeiramente, foi selecionado o bioligante Amburosideo A por ter apresentado resultados experimentais para atividade inibitória *in vitro* de MAO-B descrita na literatura e no presente estudo *in silico* de docking molecular apresentou quantidades de interações semelhantes a Selegilina (molécula padrão) em alguns aminoácidos diferentes, indicando que provavelmente possui ação inibitória diferentemente da Selegilina, podendo ser inibição reversível tendo em vista que não apresentou ligação covalente. Com isso, as modificações tiveram o objetivo de melhorar as propriedades farmacocinéticas, toxicológicas e especificar a atividade biológica. No geral, foi retirada a glicose e modificado os radicais do anel aromático do grupo catecol, no qual foi identificado como provável região toxicológica, e retirado o oxigênio do grupo éster para aumentar a lipossolubilidade para melhorar a passagem na barreira hematoencefálica.

Figura 5 – Substância natural Amburosideo A (1) e os três análogos intitulados PMC1 (2), PMC2 (3), PMC (4).



Os análogos obtidos após as modificações são da família das chalconas, no qual possuem cadeia aberta que contém um anel fenil anexado ao grupo carbonil e o outro anel benzeno ligados por um fragmento enona de três carbonos, ou seja, são cetonas α,β -insaturadas, em que um anel aromático está diretamente ligado à carbonila e o outro ao carbono β da função olefínica, essa família é bastante utilizada devido a suas várias atividades biológicas como câncer, inflamação e diabetes, com isso, muitos fármacos à base de chalconas foram aprovados para uso clínico^[44].

No estudo de Tran e colaboradores^[46], foram sintetizados análogos de chalconas para atividade antibacteriana de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. Uma dessas chalconas sintetizadas possui a mesma estrutura da PMC1, e apresentou baixa atividade antibacteriana^[45]. Outro estudo realizado com síntese de chalconas como potencial agentes antidiabéticos, também utilizaram a estrutura da PMC1, porém não obteve resultado para atividade antidiabética.

Salama e colaboradores^[47] realizaram um estudo de síntese de novos derivados de tetrazol, na qual uma dessas moléculas sintetizadas possui a mesma estrutura da PMC2. Porém, não foram feitos testes de atividade biológica, o objetivo do estudo foi mostrar a possibilidade de sintetizar por meio da reação de dienonas com o reagente tetraclorossilano-azida de sódio e sua contribuição estrutural de RMN.

No estudo de Bai e colaboradores^[48], foram sintetizadas moléculas para avaliar a atividade antitumoral. Dentre essas moléculas, uma possui a estrutura química semelhante a PMC3, no entanto, esta não apresentou atividade antitumoral *in vitro*.

No geral, encontram-se poucos estudos *in vivo* de atividade biológica neuroprotetora e antioxidante, principalmente na DP, com chalconas. Em estudo realizado por Chen et al^[49], obtiveram resultado positivo para atividade citoprotetora de uma chalcona, no qual as células foram submetidas à uma toxina que diminui as proteínas Parkin, Parkin1 e DJ-1 que estão associados com a DP, e após

o tratamento com a chalcona sintetizada foi observado um aumento significativo dessas proteínas. Por tanto, utilizar a família das chalconas para tratamento de doenças neurodegenerativas é bastante promissor.

Predição de atividade

A predição de atividade realizada pelo webservidor **PASS** se baseia na fórmula estrutural da substância, com muita precisão para mais de 3500 efeitos farmacoterapêuticos, sendo o parâmetro de probabilidade de ser ativa (P_a) e probabilidade de ser inativa (P_i) e somente é considerada uma molécula provavelmente ativa quando $P_a > P_i$. Se $P_a > 0,7$, a substância é muito provável que exiba a atividade nos experimentos, mas a possibilidade de a substância ser o análogo de um agente farmacêutico conhecido também é alta. Se $0,5 < P_a < 0,7$, a substância é susceptível de exibir a atividade nos experimentos, mas a probabilidade é menor, e é diferente da substância em que a ação farmacêutica é conhecida. Se $P_a < 0,5$, é pouco provável que exibam a atividade no ensaio da substância. No entanto, se a presença desta atividade é confirmada no experimento a substância pode ser uma nova entidade química^[50, 51].

Contudo, para predição de atividade inibitória de MAO-B, o análogo 1 (PMC1) apresentou o valor de P_a 0,238, o análogo 2 (PMC2) apresentou o valor de P_a 0,198 e o análogo 3 (PMC3) apresentou o valor de P_a 0,282. Esses resultados demonstram grande avanço para o desenvolvimento dessas moléculas planejadas como potenciais inibidores da MAO, especificamente da MAO-B, pois foram comparadas com uma variedade de moléculas que já possuem atividade, na sua maioria, comprovada para inibição da MAO-B, indicando que o planejamento está de acordo com o objetivo do estudo (Tabela 4).

Tabela 4 - Predição de atividade biológica com o webservidor **PASS** para a Selegilina e as moléculas planejadas PMC1, PMC2, PMC3.

Moléculas	P_a	P_i	Atividade
Selegilina	0,366	0,055	
PMC1	0,238	0,005	Inibição da monoamina oxidase B
PMC2	0,198	0,007	
PMC3	0,282	0,005	

No webservidor **SEA**, são utilizados dois valores estatísticos para predizer a atividade biológica de uma molécula. O E-value é o valor da expectativa de que a semelhança não seja aleatória entre os conjuntos, em que os valores mais próximos de zero ou menor que 1×10^{-10} consideram que a predição da atividade não é susceptível de estar ocorrendo por acaso. Enquanto que o Coeficiente Tanimoto (T_c) é a semelhança química esperada de valor 1^[52].

Para a molécula PMC1, foram obtidas atividades relacionadas com a DP, representadas pelos valores de E-value 4.426×10^{-35} e T_c de 0,86 para enzima humana MAO-B, e os valores de E-value 2.509×10^{-11} e T_c de 0,69 para enzima humana MAO-A, indicando que a PMC1 possui maior afinidade pela enzima MAO-B e maior probabilidade de não ser um alinhamento aleatório. Para PMC2, obtiveram-se resultados de E-value 2.342×10^{-24} e T_c 0,58 para enzima humana MAO-B, valor de E-value 9.906×10^{-08} e T_c 0,29 para enzima de camundongo MAO-B, e valor de E-value 1.408×10^{-07} e T_c 0,57 para enzima humana MAO-A, indicando que a PMC2 possui características semelhantes para interagir tanto com a enzima humana MAO-A quanto para MAO-B. Para PMC3, obteve-se resultado de E-value 7.283×10^{-14} e T_c 1 para enzima humana MAO-A, valor de E-value 2.505×10^{-28} e T_c 0,73 para enzima humana MAO-B, e valor de E-value 2.683×10^{-08} e T_c 0,35 para enzima de rato COMT, indicando que a PMC3 tem tendência, não significativa, para a MAO-A ao invés da MAO-B e ainda possui provável interação com a COMT deduzindo assim que sua ação pode ser multialvo (Tabela 5).

Tabela 5 - Predição de atividade biológica com o webserver **SEA** para a Selegilina e as moléculas planejadas PMC1, PMC2, PMC3.

Moléculas	Evalue	Coefficiente de Tanimoto (Tc)	Atividade
Selegilina	4.213e-38	1	MAO-B rato
	3651e-35	1	MAO-A rato
	2.909e-12	1	MAO-B humana
	3.929e-11	1	MAO-B bovina
	2.838e-12	0.62	MAO-A humana
	5.504e-07	0.33	MAO-A bovina
PMC1	4.426e-35	0.86	MAO-B humana
	2.509e-11	0,69	MAO-A humana
PMC2	2.342e-24	0.58	MAO-B humana
	9.906e-08	0.29	MAO-B camundongo
	1.408e-07	0.57	MAO-A humana
PMC3	7.283e-14	1	MAO-A humana
	2.505e-28	0.73	MAO-B humana
	2.683e-08	0.35	COMT rato

Viabilidade sintética

Para prever a viabilidade sintética dos compostos utilizou-se o software SYLVIA, o qual verifica através de cálculos os níveis de dificuldade de síntese, pontuando de 1 a 3 para os compostos que são fáceis de sintetizar tendo o fundo da imagem a coloração verde, 3 a 6 para os de média facilidade tendo o fundo da imagem coloração amarela e de 6 a 10 para os compostos que são muito difíceis de sintetizar tendo o fundo da imagem a coloração vermelha^[53]. O análogo 1 (PMC1) apresentou valor de 2,52 indicando ser de fácil síntese, o análogo 2 (PMC2) apresentou valor de 3,74, ou seja, média facilidade na síntese, e o análogo 3 (PMC3) foi de 2,77, de fácil síntese. As propostas são promissoras por apresentarem atividade biológica para inibidores de MAO-B e principalmente por serem possíveis de sintetizar.

Rota sintética

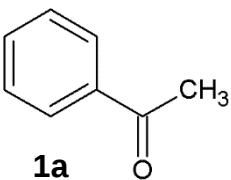
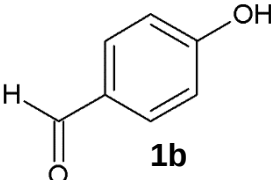
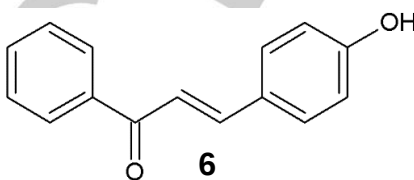
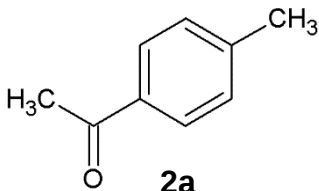
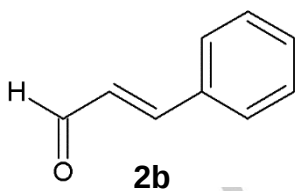
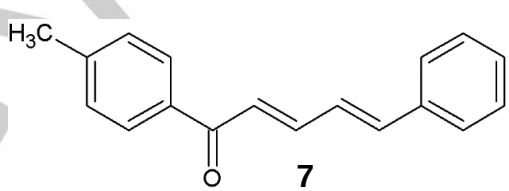
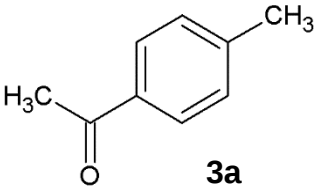
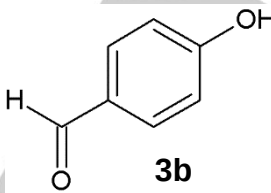
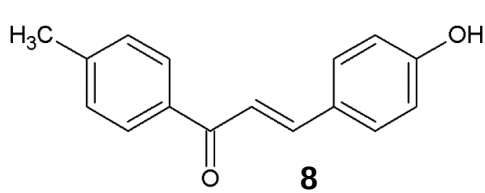
As sínteses foram feitas com a combinação de reagentes de aldeído e cetonas, permanecendo em agitação constante por 24h, com adição primeiramente da base NaOH 6M e posteriormente com o ácido HCl 10% para haver precipitação.

Em um balão de 250 mL foi adicionado 30 mL de etanol, o correspondente aldeído e a correspondente cetona em quantidade indicada na Quadro 1. A reação permaneceu por 5 min em agitação magnética. Em seguida foi adicionado lentamente 5 mL de NaOH (6 mol/L) e a reação permaneceu em agitação magnética por 12h à temperatura ambiente. Após este período, transferiu-se a mistura para um frasco Béquer (500mL) contendo aproximadamente 100g de gelo picado e 15 mL de HCl 10%. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado (5x100mL) com água gelada, e posteriormente foi realizada a medição da temperatura de fusão das moléculas, essa metodologia está exemplificada no esquema 1.

Os análogos planejados (Quadro 1) foram sintetizados via reação de condensação aldólica (Claisen-Schmidt), resultando nos compostos α,β -insaturados em bons rendimentos. As enonas foram caracterizados por RMN ¹H e ¹³C, como dupletos característicos na região de 7 a 8 ppm com uma constante de acoplamento próximo de 16 Hz, correspondente a olefina de geometria *trans*. No espectro de massas é comum para esses tipos de substâncias que o sinal referente ao pico base coincide com o íon molecular, como m/z 224 (100), 248 (100), 238 (100), para a PMC1, PMC2, PMC3, respectivamente. (material suplementar). No quadro 1,

resumidamente apresentadas as reações: reação 1 utilizado a acetofenona e o 4-hidroxibenzaldeído para obter o produto (2E) -3- (4-hidroxifenil) -1-fenilprop-2-en-1-ona (**6**), na reação 2 foi utilizado a 4-metilacetofenona e o cinemaldeído obtendo o produto (2E, 4E) -1- (4-metilfenil) -5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**7**), e a reação 3 com a 4-metilacetofenona e o 4-hidroxibenzaldeído obtendo o produto (2E) -3- (4-hidroxifenil) -1- (4-metilfenil) prop-2-en-1-ona (**8**).

Quadro 1. As reações químicas e seus respectivos reagentes aldeído e cetona.

Reação	Cetona (mmol)	Aldeído (mmol)	Produto (%)
1	 1a	 1b	 6
2	 2a	 2b	 7
3	 3a	 3b	 8

Acetofenona (1a); 4-hidroxibenzaldeído (1b); PMC1 (**6**); 4-metilacetofenona (2a); cinemaldeído (2b); PMC2 (**7**); 4-metilacetofenona (3a); 4-hidroxibenzaldeído (3b); PMC3 (**8**).

Avaliação da toxicidade aguda

Sujeitos e procedimento de criação

Os animais foram mantidos na plataforma zebrafish do laboratório de Pesquisa em Fármacos na temperatura $26 \pm 2^\circ \text{C}$ com ciclo de luz de 10 horas claro/14 horas escuro. Foi utilizada água normatizada (ISSO 1996) para a manutenção dos peixes adultos. Para a produção de água padronizada, utilizou-se água deionizada e os seguintes sais foram adicionados: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (117 mg/L), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (49,3 mg/L), NaHCO_3 (25,9 mg/L) e cloreto de potássio (2,3 mg/L) (Sigma Aldrich).

Os peixes adultos foram alimentados com ração comercial e *Artemia salina*. Estes foram tratados de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de experimentação. O comportamento dos peixes foi avaliado por um observador humano e filmado, após uma semana em condições normais e sob tratamento.

Ensaio de toxicidade da substância estudada

Das três moléculas sintetizadas, PMC1, PMC2 e PMC3, somente a PMC3 apresentou predição de atividade para inibição tanto da MAO-B quanto para COMT as duas enzimas relacionadas com a degradação da dopamina sugerindo provável ação multialvo, portanto, foi selecionada para realizar o ensaio de toxicidade aguda *in vivo* no modelo animal Zebrafish. Para o ensaio de toxicidade

aguda por via oral e intraperitoneal, foram utilizados quatro grupos com três peixes em cada grupo para cada via, tendo no total 24 peixes. Nesse trabalho, administrou-se uma única dose da PMC3 e realizado a observação após 24h para identificar se houve morte nos grupos, sendo administrado as concentrações de 350 mg/kg, 750 mg/kg, 1500 mg/kg e 2500 mg/kg. De acordo com as recomendações do protocolo OECD 236^[54] após administrar 2000 mg/kg da substância testada e a taxa de mortalidade for 0%, indica que essa substância provavelmente não é tóxica.

Devido as chalconas não apresentarem boa solubilidade em água, foi necessário adicionar à água destilada o DMSO e Teewn 80 para obter uma concentração mãe de 200mg/mL, assim foi possível diluir conforme o peso corporal de cada peixe. Após a administração, os peixes foram avaliados durante 7 dias e não apresentaram diferenças significativas no comportamento e apresentou taxa de mortalidade de 0%

Conclusão

Esse estudo foi dividido em três partes: modelagem molecular, rota sintética e toxicidade aguda *in vivo*, com o objetivo de obter um candidato a fármaco com atividade inibitória da MAO-B para o tratamento da Doença de Parkinson. Deste modo, as substâncias naturais (Amburoside A, Harmam, Harmalina e Harmalol) selecionadas para o estudo *in silico* do farmacóforo, docking molecular, propriedades farmacocinéticas e toxicológicas demonstraram resultados satisfatórios indicando maior probabilidade de boa absorção e distribuição, além de atividade inibitória da MAO-B devido apresentar interação com o sítio ativo da enzima previsto pelo docking.

Com base nesses resultados, a Amburoside A foi indicada como bioligante para propor as modificações, e assim obteve-se 3 moléculas da família das chalconas nomeadas PMC1, PMC2 e PMC3, apesar de já existirem no banco de dados virtual, essas moléculas não possuem estudos para o tratamento de doença do sistema nervoso central, e na maioria sendo para atividade antimicrobiana em que não apresentaram bons resultados. Portanto, foram realizadas também as predições de atividade e viabilidade sintética, em que as três moléculas apresentaram atividade para inibição da MAO. Destaca-se a predição, também, da PMC3 para atividade inibitória COMT indicando que esta molécula provavelmente possui ação multialvo, além de apresentar fácil síntese. Na etapa da síntese, foi possível sintetizar as três moléculas com rendimento médio de 40%, confirmando a predição da viabilidade sintética. Posteriormente, a PMC3 foi selecionada para realizar o teste de toxicidade aguda no Zebrafish, devido sua ação provável ação multialvo, e mesmo com a mais alta dose (2000 mg/Kg) administrada, o índice de mortalidade na população estudada foi 0%, indicando a falta de toxicidade nesse parâmetro. Com isso, esse estudo demonstra a importância da Modelagem Molecular em diminuir o tempo e o custo da pesquisa, além de propor três novos potenciais candidatos a fármaco para o tratamento da Doença de Parkinson.

Sessão experimental

Busca pelas estruturas das substâncias naturais

Para propor novos candidatos a fármaco com atividade biológica antiparkinsoniana com a inibição da enzima monoamina oxidase B (MAO-B) para o tratamento da DP, primeiramente, foi realizada uma busca em banco de dados *online* com os descritores em inglês “medicinal plants”, “antiparkinsonian activity” e “natural compounds”, para encontrar substâncias naturais que são descritos na literatura com atividade antiparkinsoniana, antioxidante ou neuroprotetora em experimentos *in vitro* ou *in vivo* em modelos animais com DP induzido.

Derivação do padrão farmacofórico

O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais dos bioligantes estudados através dos quais se define os possíveis tipos de interação que os ligantes em comum podem fazer com o sítio receptor^[12]. O padrão farmacofórico foi determinado a partir do servidor online PharmaGist (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>)^[13] e observada a sua imagem no webserver ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu/pharmer.html>).

Estudo de *docking* molecular

O *docking* molecular é um método computacional para identificar o modo de interação 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^[14]. O programa GOLD 5.4 (do inglês, “Genetic Optimisation for Ligand Docking”) foi utilizado para simulação da interação entre os ligantes e a enzima MAO-B através de cálculos que empregam o algoritmo genético para fins de experimentos de *docking* flexível de ligantes dentro de sítios de ligação de proteínas^[15].

Predição das propriedades farmacocinéticas (adme) e toxicológicas

Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME)

Para as propriedades farmacocinéticas foram utilizados os parâmetros de absorção oral humana (AOH), permeabilidade celular em células Caco-2 e MDCK e a penetração da barreira Hematoencefálica (pBHE), assim como, as propriedades relacionadas a regra dos cinco (logP, massa molecular, doadores de hidrogênio, e aceptadores de hidrogênio) para as substâncias naturais, usando o módulo QikProp do software Schrödinger^[16].

Predição das Propriedades toxicológicas

As propriedades toxicológicas substâncias naturais foram preditas utilizando-se o programa DEREK (Deductive Estimate of Risk from Existing Knowledge)^[17]. O DEREK dispõe de um sistema que realiza predições de toxicidade, tais como mutagenicidade, carcinogenicidade, sensibilização da pele, irritação, efeitos reprodutivos, neurotoxicidade, entre outras, através das regras de correlação implementada no programa^[18,19].

Modificações estruturais, predição de atividade e viabilidade sintética

As modificações na estrutura das moléculas estudadas foram realizadas baseando-se no estudo do docking, nas propriedades de farmacocinéticas e toxicológicas significativas. Além disso, pôde-se prever, também, a atividade dos novos compostos propostos utilizando o programa PASS (<http://www.akosgmbh.de/pass/index.html>), o qual prediz com alta acurácia (70- 80%) até 2000 atividades biológicas para compostos químicos. E o SEA (<http://sea.bkslab.org/>) que utiliza a abordagem de conjunto de semelhança das moléculas relacionada às proteínas com base na similaridade química estabelecida entre seus ligantes, através da busca em grandes bancos de dados de compostos e criar mapas de similaridade de destino cruzado.

A predição da viabilidade sintética foi realizada utilizando o programa SYLVIA online (http://www.molecular-networks.com/online_demos/sylvia/), no qual indica se a molécula possui características de fácil (verde), média (amarelo) ou difícil (vermelho) síntese.

Rota sintética

A síntese dos análogos propostos foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica (BIORG) coordenado pelo Prof. Irlon Maciel. Em pesquisa realizada previamente na literatura por plantas medicinais com ação antiparkinsoniana, percebeu-se que a maioria das substâncias naturais tinha um núcleo chalconico, e tendo em vista que o BIORG possui uma metodologia padronizada de síntese para substâncias da classe chalconas, foi utilizada a mesma rota sintética padronizada.

A busca pelos compostos orgânicos que apresentam atividade como inibidores de MAO-B para tratamento da DP foram a partir de núcleos chalconicos. As chalconas foram sintetizadas via reação de condensação aldólica cruzada, onde em um balão de 125 mL foi adicionado 30 mL de etanol, o aldeído (3,1 mmol) e a cetona (3 mmol) correspondente. A reação permaneceu em agitação por 5 min a temperatura ambiente e em seguida foi adicionado 5 mL de NaOH (5 mol.L⁻¹) e deixou-se a reação em agitação por mais 24 h. Após este período, a mistura foi transferida para um Béquer (500 mL) contendo aproximadamente 100 g de gelo picado e 15 mL de HCl (10%). O precipitado formado foi recristalizado com etanol a quente. Todas as substâncias foram caracterizadas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1H e 13C que foi realizada na Universidade de São Paulo campus de São Carlos, Espectroscopia de Infravermelho e Cromatografia à Gás – Espectrometria de Massas que foram realizadas na Universidade Federal do Amapá campus Marco Zero.

Toxicidade aguda em modelo zebrafish

Sujeitos e procedimento de criação

Os Zebrafish adultos (aproximadamente 0,3 g de peso) foram criados na Plataforma ZebraFish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, coordenado pelo Prof. Dr. José Carlos Tavares, da Universidade Federal do Amapá, seguindo protocolos padrões de cuidados e de manutenção de peixe. A variância ambiental foi mantida, no mínimo, para todos os experimentos comportamentais. Os Zebrafish adultos foram mantidos em água

deionizada contendo 200 mg/L de sal. Todos os procedimentos de cuidados com animais foram submetidos ao Comitê de Ética de uso animal da Universidade Federal do Amapá.

Teste de toxicidade aguda

Esse teste consiste em administrar no peixe a molécula estudada em uma determinada dose e, caso o peixe sobreviva no mínimo 7 dias, indica alta probabilidade da substância não ser tóxica. Para a realização desse teste foram utilizadas duas vias de administração, tanto via oral, devido a substância planejada e sintetizada ser indicada como um candidato a fármaco por via oral, e a via intraperitoneal por ser a via de administração da neurotoxina utilizada em outros estudos. Para o teste foram utilizados 12 peixes adultos divididos em quatro grupos, contendo três peixes cada grupo, e administrada a substância PMC3 em jejum uma vez em quatro concentrações diferentes, 350 mg/kg, 750 mg/kg, 1500 mg/kg e 2500 mg/kg, sendo diluída 0,250g de PMC3 em 900 µg/mL de água, 90 µg/mL de DMSO e 10 µg/mL de Tween 80.

Considerações éticas

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Amapá – CEUA-UNIFAP é um órgão deliberativo e de assessoramento da Administração Superior da Universidade em matéria normativa e consultiva, nas questões sobre a utilização de animais para o ensino e a pesquisa. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo protocolo 013/2018 por este Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA).

Referências

- [1] R. Savica, B. R. Grossardt, W. A. Rocca, J. H. Bower. *Mov Disord.* **2018**, 33, 4, 537–543.
- [2] D. Wang, R-Y. Hong, M. Guo, Y. Liu, N. Chen, X. Li, D-X. Kong. *Molecules*, **2019**, 4003, 24.
- [3] H. C. Campos, M. D. Rocha, F. P. D. Viegas, P. C. Nicastro, P. C. Fossaluzza, C. A. M. Fraga, E. J. Barreiro, C. Viegas Jr. *CNS & Neurol. Disord. DrugTargets*, **2011**, 10, 2, 239-250.
- [4] C. Follmer, H. J. C. B. Netto. *Quim. Nova*, **2013**, 36, 2, 306-313.
- [5] J. P. M. Finberg, J. M. Rabey, *Fronteiers in Pharmacology*, **2016**, 340, 7.
- [6] Marino, B. L. B.; Souza, L. R.; Sousa, K. P. A.; Ferreira, J. V.; Padilha, E. C.; Silva, C. H. T. P.; Taft, C. A.; Hage-Melim, L. I. S. **2020**, *Mini Rev Med Chem*, 20, 9, 754-767.
- [7] J. R. G. S. Almeida. *Scientia Plena*, **2010**, 6, 11.
- [8] S. P. Ingale, S. B. Kasture. *Anc Sci Life*, **2017**, 36, 4, 200–206.
- [9] E. H. B. Maia, L. C. Assis, T. A. Oliveira, A. M. Silva, A. G. Taranto, *Frontiers in Chemistry*, **2020**, 343, 8.
- [10] A. E. Espino-saldaña, R. R. Ortiz, E. P. Jaramillo, A. M. Torres. *Current Neuropharmacology*, **2020**, 18, 136-152.
- [11] S. Bretaud, S. Lee, S. Guo. *Neurotoxicology and Teratology*. **2004**, 26, 857–864.
- [12] Y. Inbar, D. Schneidman-Duhovny, O. Dror, R. Nussinov, H. J. Wolfson. *Research in Computational Molecular Biology: 11th Annual International Conference, RECOMB 2007*, Oakland, CA, USA, April 21-25.
- [13] D. Schneidman-Duhovny, O. Dror, Y. Inbar, R. Nussinov, H. J. Wolfson. *Nucl.Acids.Res.* **2008**, 36, W223-W228.
- [14] S. Gupta, C. G. Mohan. *Biomed Res Int*, **2014**.
- [15] M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshom, C. W. Murray, R. D. Taylor. *Proteins*, **2003**, 52, 4, 609-623.
- [16] *SCHRÖDINGER RELEASE 2018-1*: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2018**.
- [17] J. E. Ridings, M. D. Barratt, R. Cary. *Toxicology*. **1996**, 106, p. 267-279.
- [18] J.E. Ridings, M.D. Barrattb, R. Gary, C.G. Earnshawd, C.E. Eggingtond, M.K. Ellis, P.N. Judsonf, J.J. Langowskig, C.A. Marchantg, W.P. Watson, T.D. YIH. *Toxicology*. **1996**, 106, 267-279.
- [19] N. F. Cariello, J. D. Wilson, B. H. Britt, D. J. Wedd, B. Burlinson, V. Gombar, *Mutagenesis*. **2002**, 17, 321-329.
- [20] L. K. Leal, H.V. N. Júnior, G.M.A. Cunha, M. O. Moraes, C. Pessoa, R. A. Oliveira, E. R. Silveira, K. M. Canuto. G. S. B. Viana. *Neurosci. lett.*, **2005**, 2, 86–90.
- [21] Accelrys discovery studio. v. 4.0, T.C., San Diego, CA 92121 USA. 2007.
- [22] S. P. Ingale, B. K. Sanjay. *Orient Pharm Exp Med*. **2014**.
- [23] T. Tábi, L. Vécsei, M. B. Youdim, P. Riederer, É. Szökő. *Journal of Neural Transmission*, **2019**, 127, 831–842.
- [24] K. M. Canuto, E.R. Silveira. *Quim. Nova*, **2006**, 29, 6, 1241-1243.
- [25] V. P. Ribeiro, C. Arruda, M. A. El-Salam, J. K. Bastos. *Pharmaceutical Biology*, **2018**, 56, 1, 253–268.
- [26] K. Dhawan, S. Kumar, A. Sharma. *Journal of Ethnopharmacology*, **2001**, 78, 165–170.
- [27] V. Vyas, A. Jain, A. Jain, A. Gupta. Virtual screening: a fast tool for drug design. *Scientia Pharmaceutica*, p. 333-360, 2008.
- [28] J. Hagenow, S. Hagenow, K. Grau, M. Khanfar, L. Hefke, E. Proschak, Holger. Stark, *Drug Design, Development and Therapy*, **2020**, 14, 371–393.
- [29] B. Mathew, A. A. Adeniyi, S. Dev, Yurtsever, M. Joy, G. Ucar, G. E. Mathew, A. Singh-Pillay, M. E. Soliman. *J. Phys Chem B*. **2017**, 121, 6, 1186-1203.

- [30] J.C. Cole, C.W. Murray, J.W.M. Nissink, R.D. Taylor, R. Taylor. *Proteins*, **2005**, 60, 325–332.
- [31] L.C.S. Picanço, L.L. Castro, A.A. Pinheiro, K.R. Silva, L.R. Souza, F.S. Braga, C.H.T.P. Silva, C.B.R. Santos, L.I.S. Hage-Melim. *British Journal of Pharmaceutical Research*, **2015**, 7, p.152-175.
- [32] J.A.R. Rodrigues. *Química Nova*, **2000**, 6, 23.
- [33] C. Binda, M. Aldeco, W. J. Geldenhuys, M. Tortorici, A. Mattevi; D. E. Edmondson, *Med.Chem.Lett.*, **2012**, 3, 39–42.
- [34] P. Dhiman, N. Malik, A. Khatkar. *BMC Chemistry*, **2020**, 14, 12.
- [35] S. Yamashita, T. Furubayashi, M. Kataoka, T. Sakane, H. Sezaki, H. Eur. Tokuda, *J. Pharm.* **2000**, 10, 195,.
- [36] N. S. R. Silva, C. F. Santos, L. K. S. Gonçalves, F. S. Braga, J. R. Almeida, C. S. Lima, D. S. B. Brasil, C. H. T. P. Silva, L. I. S. Hage-Melim, C. B. R. Santos. *British Journal of Pharmaceutical Research*, **2015**, 7, 247-263.
- [37] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3, 3-26.
- [38] B. Jiang, L. Meng, N. Zou, H. Wang, S. Li, X. Cheng, Z. Wang, W. Chen, C. Wang, *Phytomedicine*. **2019**, 62, 152-967.
- [39] W. Muster, A. Breidenbach, H. Fischer. *Drug Discov Today*. **2008**, 13, 303-10.
- [40] M. D. Barratt, J. J. J. Langowski. *Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1999**, 39, 2, 294–298.
- [41] E. Estrada, G. Patlewicz, Y. Gutierrez. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2004**, 44, 2, 688–698.
- [42] K. Langton, G. Patlewicz, A. Long, C. Marchant, D. Basketter. *Contact Dermatitis*. **2006**, 55, p. 342–347.
- [43] Y. S. Is, S. Durdagi, B. Aksoydan, M. Yurtsever. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, 9, 1768–1782.
- [44] C. Zhuang, W. Zhang, C. Sheng, W. Zhang, C. Xing, Z. Miao. *Chem Rev.* **2017**, 117, 12, 7762–7810.
- [45] T.-D. Tran, T.-Ha. Do, N.-C. Tran, T.-D. Ngo, T.-N.-P. Huynh, C.-D. Tran, K.-M. Thai. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, 4555–4560.
- [46] C.-T. Hsieh, T.-J. Hsieh, M. El-Shazly, D.-W. Chuang, Y.-H. Tsai, C.-T. Yen, S.-F. Wua, Y.-C. Wua, F.-R. Chang. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, 3912–3915.
- [47] T. A. Salama, A.-A. S. El-Ahl, A.-G. M. Khalil, M. M. Girges, B. Lackner, C. Steindl, S. S. Elmorsy. *Monatshefte für Chemie*, **2003**, 134, 1241–1252.
- [48] X. Bai, W. Q. Shi, H. F. Chen, P. Zhang, Y. Li, S. F. Yin. *Chemistry of Natural Compounds*, 2012, 48, 1.
- [49] Y.-F. Chen, S.-N. Wu, J.-M. Gao, Z.-Y. Liao, Y.-T. Tseng, F. Fülöp, F.-R. Chang, Y.-C. Lo. *Molecules*, **2020**, 25, 2907.
- [50] D. Filimonov, V. Poroikov, Y. Borodina, T. Glorizova. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1999**, 39, 666-670.
- [51] J. V. Ferreira, G. A. Chaves, B. L. B. Marino, K. P. A. Sousa, L. R. Souza, M. F. B. Brito, H. R. C. Teixeira, C. H. T. P. Da Silva, C.; B. R. Santos, L. I. S. Hage-Melim, *ChemMedChem*, **2017**, 12, 16, 408-1416.
- [52] M. J. Keiser, B. L. Roth, B. N. Armbruster, P. Ernsberger, J. J. Irwin, B. K. Shoichet, *Nat Biotech*, **2007**, 25, 197-206.
- [53] K. Boda, J. Gasteiger, T. Seidel. *J Comput Aided Mol Des.* **2007**, 21, 6, 311-325.
- [54] ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÓMICO – OECD. *Test no. 236: Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET)*. Paris: OECD, **2013**, 22 p.

Material suplementar

(*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one

$C_{15}H_{12}O_2$, 224.08 g.mol⁻¹; (77% yield); (white solid): FTIR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) = 3219.33, 3066.95, 3020.66, 1896.11, 1869.1, 1686.33, 1649.21, 1579.77, 1564.34, 1512.26, 1352.16, 1284.65, 1219.06, 1168.91, 1041.61, 977.95, 833.28, 781.2, 690.55, 661.61, 538.16, 518.87, 418.57; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.04 – 8.01 (m, 2H), 7.79 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.61 – 7.56 (m, 3H), 7.54 – 7.50 (m, 2H), 7.42 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.92 – 6.89 (m, 2H), ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 190.86, 158.07, 138.43, 132.63, 130.48, 128.58, 128.44, 119.79, 116.00.; MS (70 eV) m/z = 224 (100), 207 (15), 147 (59), 130 (12), 94 (34), 77 (56).

Figure S1. FT- IR of (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**6**).

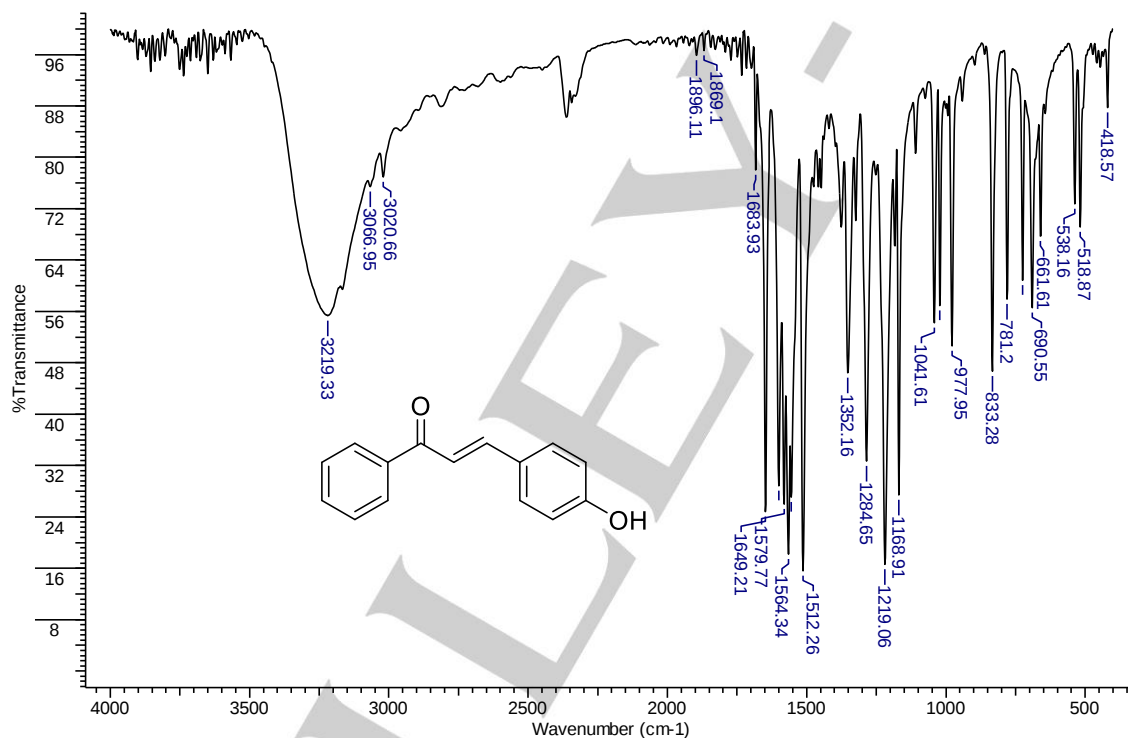


Figure S2. MS (70 eV) of (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**6**).

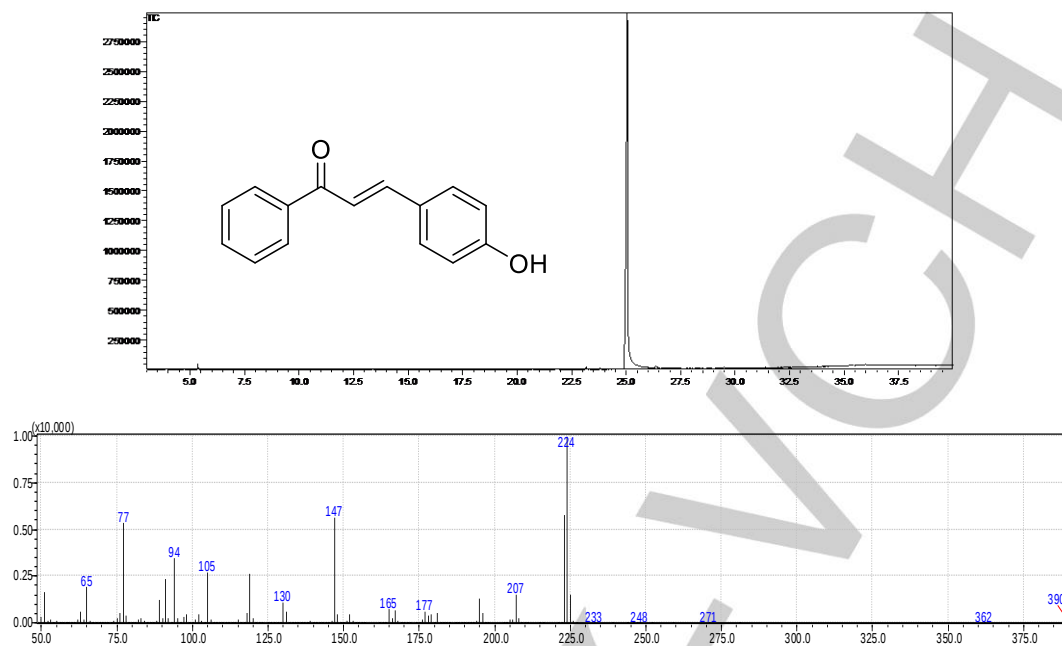


Figure S3. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) of (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**6**).

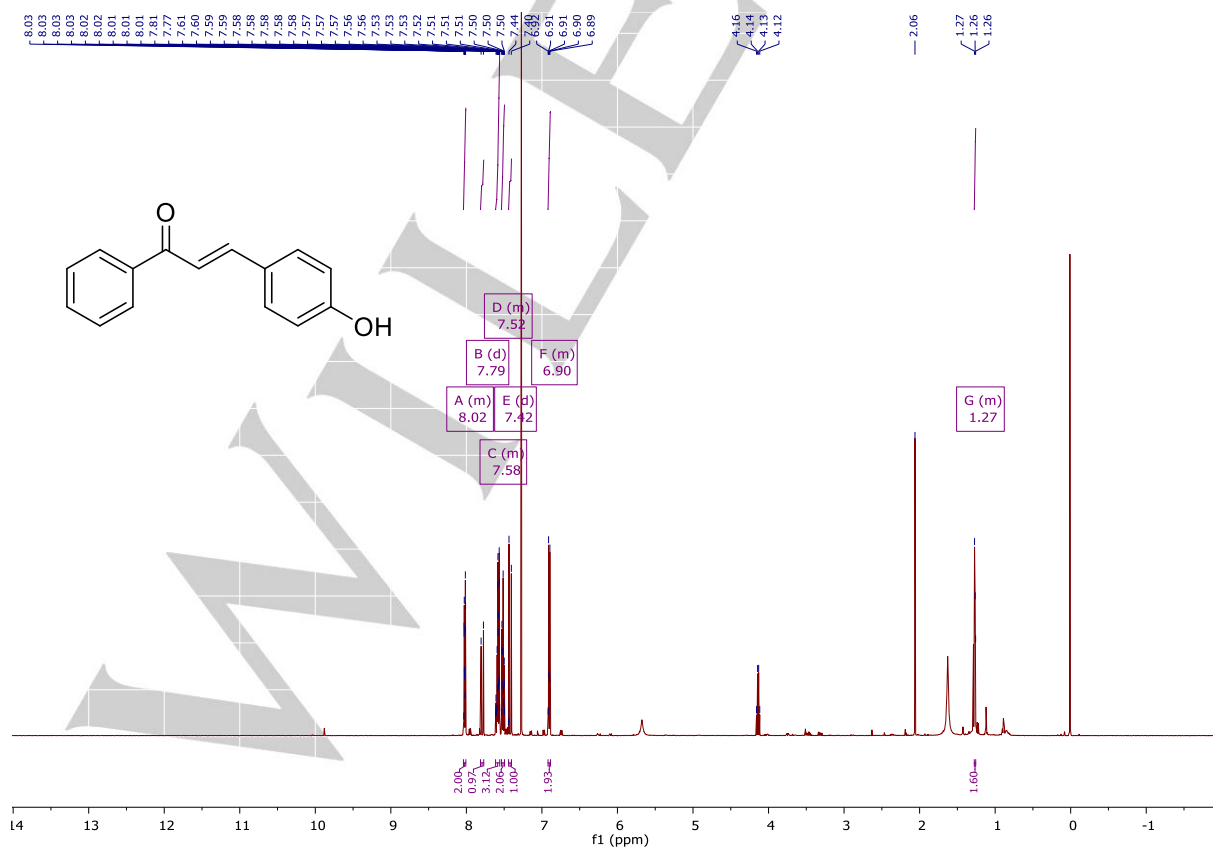
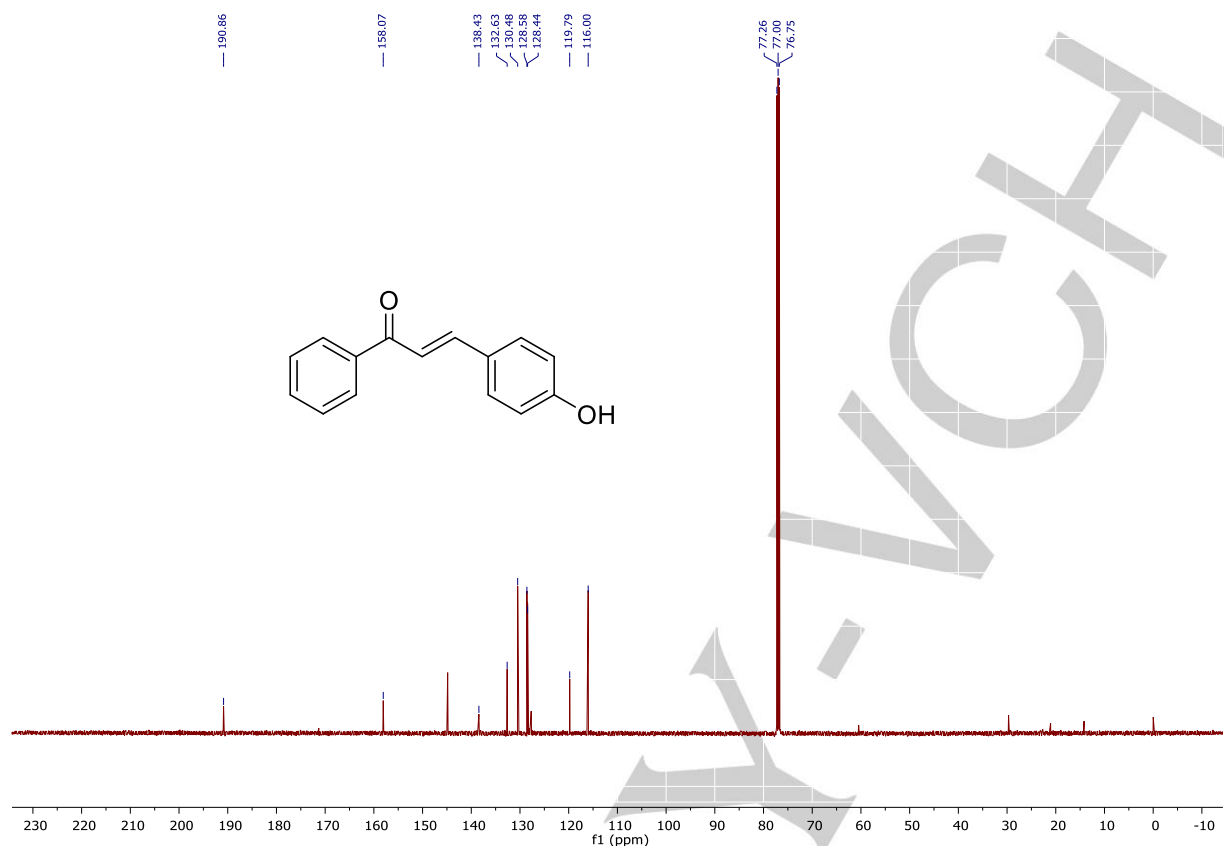


Figure S4. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) of (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one(**6**).



(*2E,4E*)-5-phenyl-1-(*p*-tolyl)penta-2,4-dien-1-one

$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}$, 248.12 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; (46% yield); (White solid): m.p. = 70-73 $^{\circ}\text{C}$; FTIR ν_{max} (cm^{-1}) = 32059.23, 3026.44, 1942.4, 1869.1, 1680.07, 1651.1, 1604.84, 1548.91, 1446.67, 1348.3, 1286.58, 1249.93, 1182.41, 1153.84, 1014.6, 977.24, 814, 781.2, 723.34, 680.9.; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.91 – 7.88 (m, 2H), 7.51 – 7.48 (m, 2H), 7.39 – 7.35 (m, 2H), 7.34 – 7.25 (m, 3H), 7.02 (d, J = 8.1 Hz, 2H).; ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 190.03, 144.43, 143.49, 141.63, 136.19, 135.67, 129.30, 129.15, 128.85, 128.55, 127.27, 127.05, 125.51, 77.28, 77.03, 76.77, 21.66.; MS (70 eV) m/z = 248 (100), 233 (22), 215 (22), 205 (25), 171 (45), 119 (52), 105 (20), 91 (55), 77 (15), 65 (24).

Figure S5. FT-IR of (2*E*,4*E*)-5-phenyl-1-(*p*-tolyl)penta-2,4-dien-1-one (7).

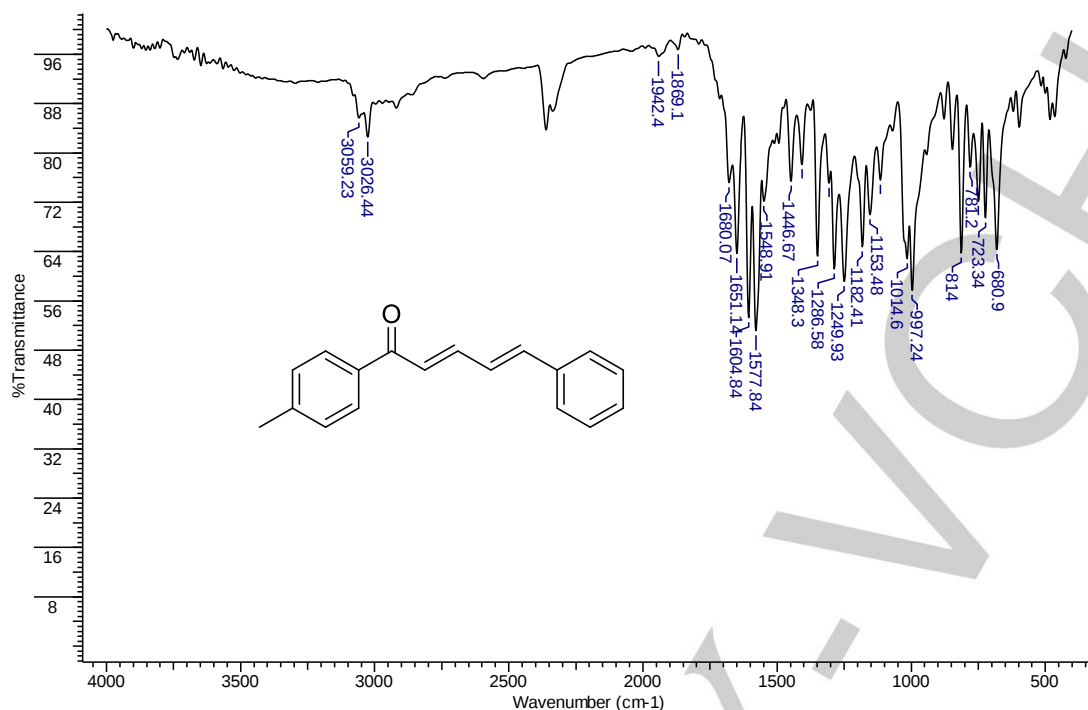


Figure S6. MS (70 eV) of (2*E*,4*E*)-5-phenyl-1-(*p*-tolyl)penta-2,4-dien-1-one (7).

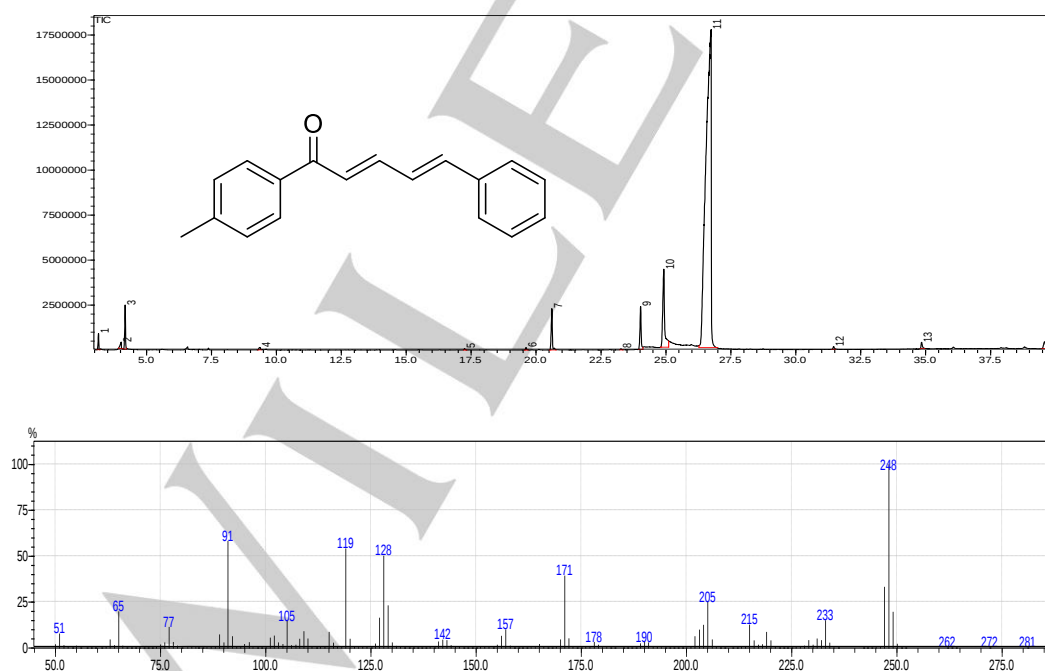


Figure S7. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) of (2*E*,4*E*)-5-phenyl-1-(*p*-tolyl)penta-2,4-dien-1-one(7).

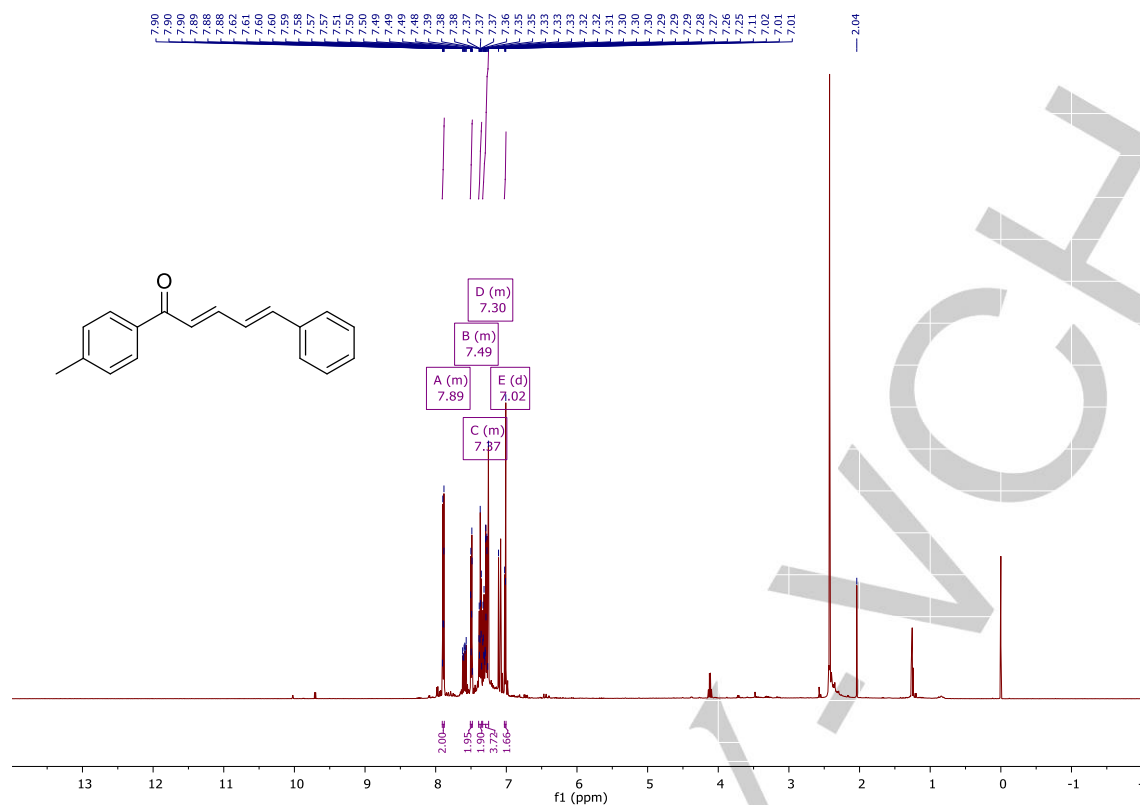
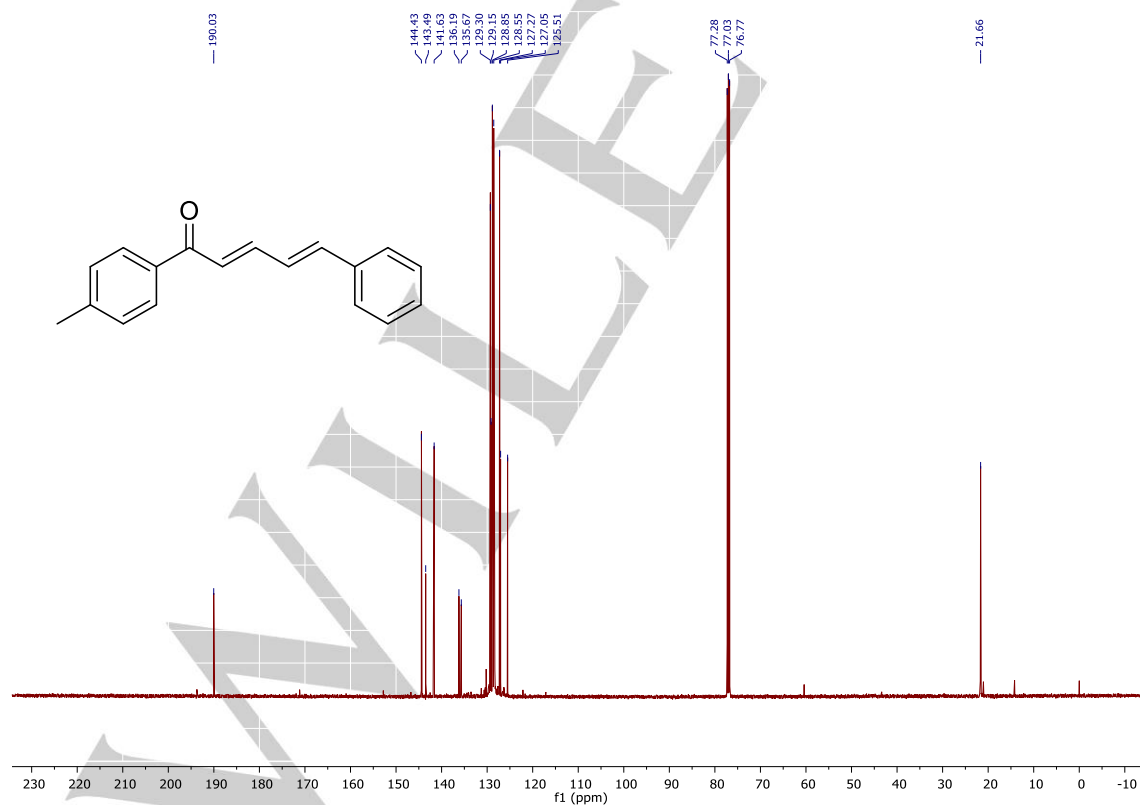


Figure S8. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) of (2*E*,4*E*)-5-phenyl-1-(*p*-tolyl)penta-2,4-dien-1-one (7).



(*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(*p*-tolyl)prop-2-en-1-one

C₁₆H₁₄O₂, 238.10 g.mol⁻¹; (4.8% yield); (White solid): FTIR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) = 3213.55, 3057.3, 3020.44, 2073.57, 2021.49, 1647.28, 1606.77, 1575.91, 1512.26, 1585.25, 1485.25, 1458.25, 1338.66, 1278.86, 1220.99, 1170.84, 1114.9, 1037.75, 977.95, 844.86, 738.77, 705.98, 605.67, 530.45, 472.58.; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.94 – 7.91 (m, 2H), 7.77 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.57 – 7.54 (m, 2H), 7.41 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 6.91 – 6.88 (m, 2H), 1.65 (s, 3H).; ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 190.46, 158.12, 144.54, 143.53, 135.82, 130.44, 129.31, 128.62, 127.72, 119.73, 116.01, 77.27, 77.22, 77.01, 76.76, 21.67.; MS (70 eV) *m/z* = 238 (100), 223 (26), 195 (15), 147 (30), 119 (45), 91 (70), 65 (35).

Figure S9. FT-IR of (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(*p*-tolyl)prop-2-en-1-one (**8**).

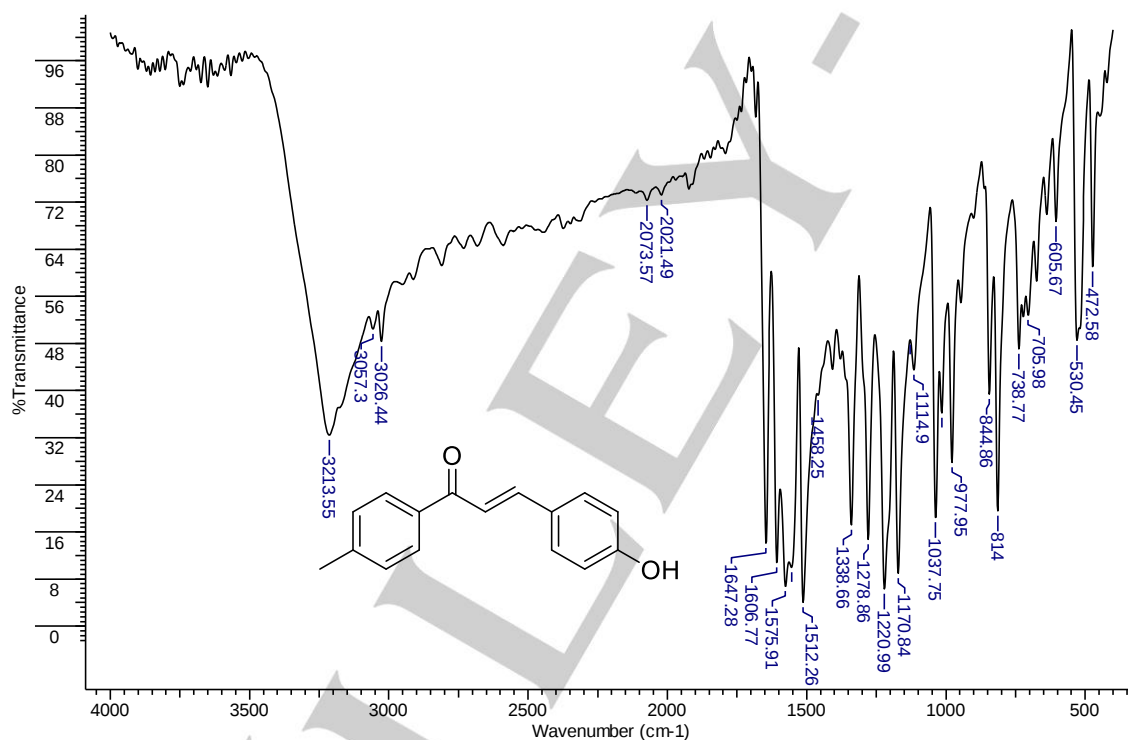


Figure S10. MS (70 eV) of (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(*p*-tolyl)prop-2-en-1-one (**8**).

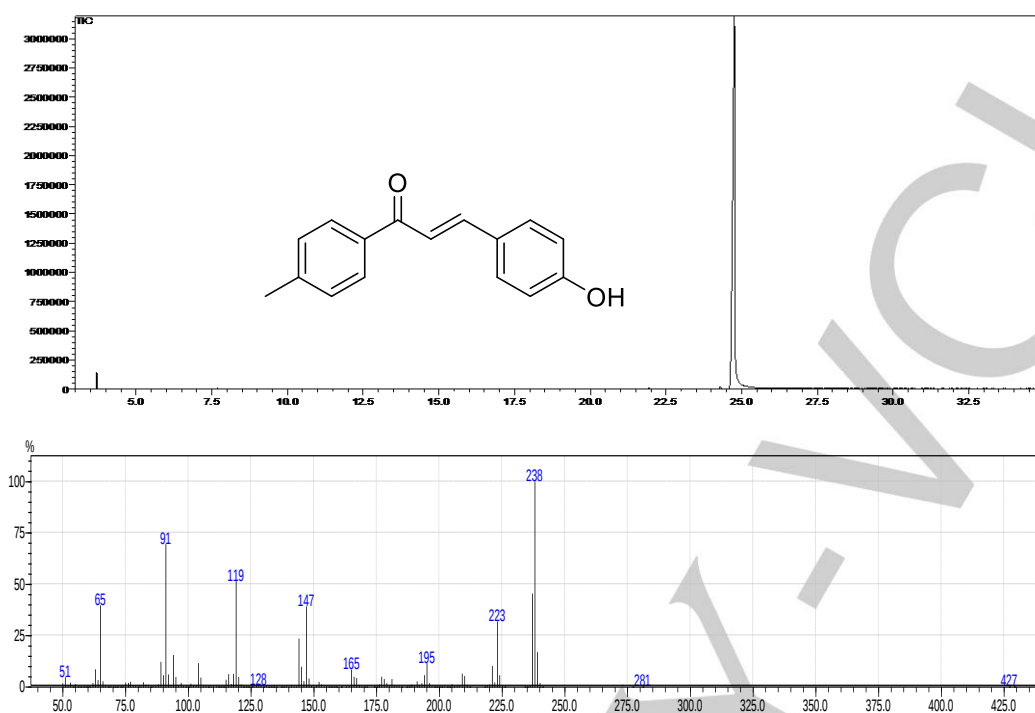


Figure S11. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) of (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(*p*-tolyl)prop-2-en-1-one (**8**).

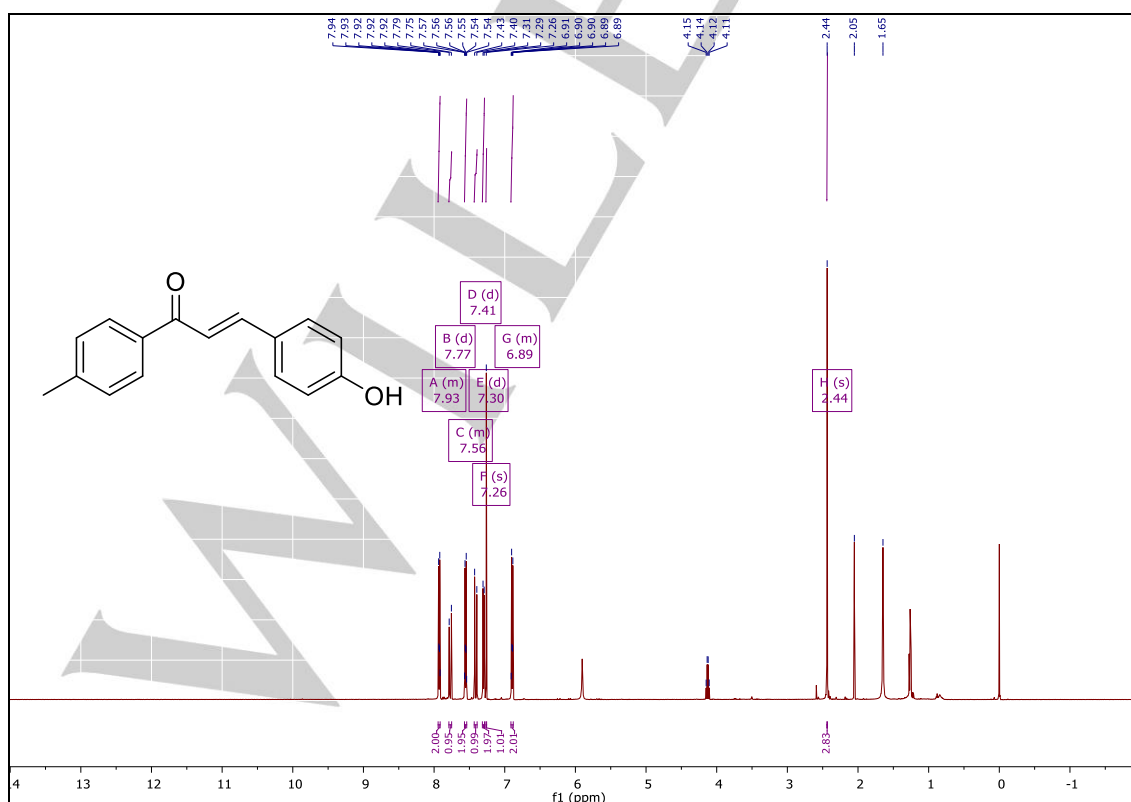
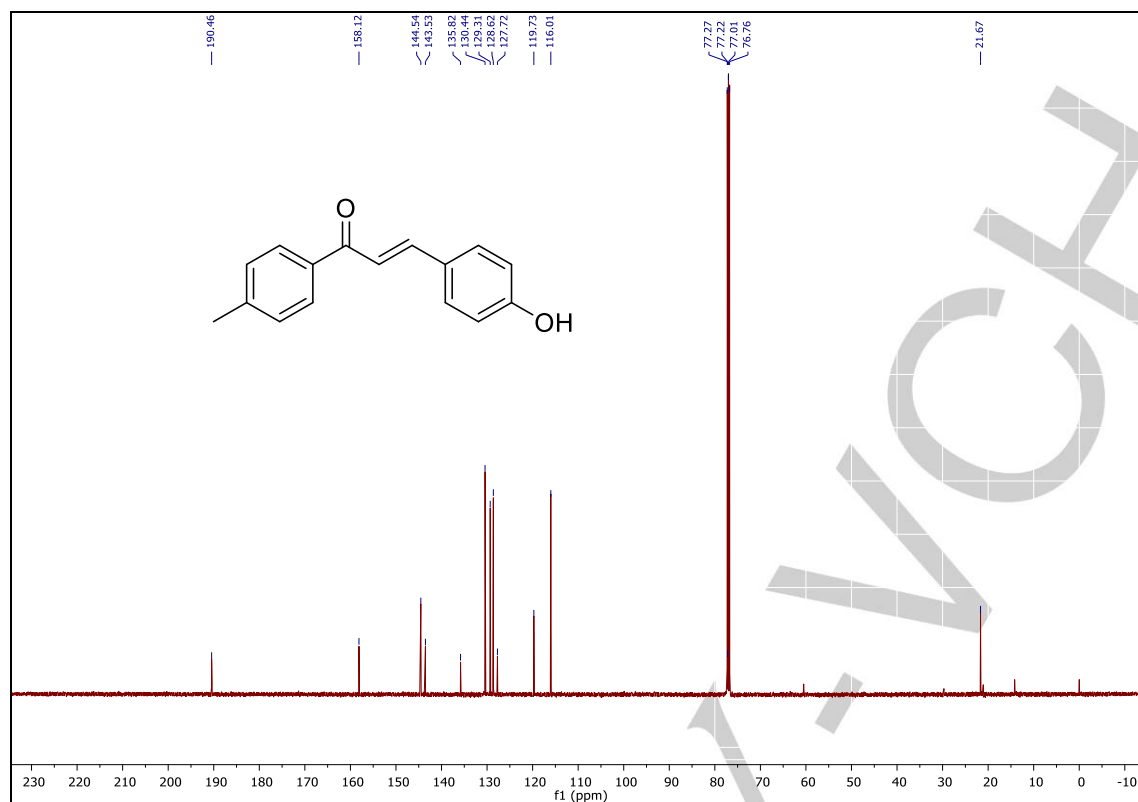


Figure S12. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) of (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(*p*-tolyl)prop-2-en-1-one (**8**).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Para pesquisa de novos fármacos são necessários vários estudos, dentre eles os estudos *in silico* e *in vivo* que servem para auxiliar o pesquisador alcançar o objetivo da pesquisa. Com os estudos *in silico*, é possível realizar uma triagem para a escolhas das moléculas que seriam testadas *in vivo*, assim diminui o tempo e o custo da pesquisa. Enquanto que o estudo *in vivo* garante maior confiabilidade aos resultados dos estudos anteriores, pois podem ser avaliados critérios relacionados ao organismo vivo.

Com isso, utilizou-se nesse estudo os ensaios *in silico* e *in vivo* com o objetivo de propor um candidato a fármaco com ação inibitória da MAO-B para o tratamento da Doença de Parkinson. No estudo *in silico*, foi possível encontrar quatro substâncias naturais e ao serem comparadas com a Selegilina, para escolher entre as quatro um bioligante para propor as modificações, porém no decorrer da pesquisa, uma substância de origem natural, Harmalina, se destacou por possuir características semelhantes às da Selegilina, principalmente em relação a sua interação com a enzima MAO-B, sugerindo que a substância poderia interagir da mesma forma irreversível ocasionando os efeitos colaterais indesejados aos pacientes.

Após analisar atentamente, outra substância natural, Amburosídeo A, mesmo não apresentando os melhores resultados farmacocinéticos e toxicológicos, demonstrou o mesmo nível de interação com a enzima em comparação à Selegilina, porém em aminoácidos diferentes aos quais a Selegilina interage, sugerindo que sua ação inibitória é diferente. Tendo em vista esse impasse entre as duas substâncias de origem natural, buscou-se na literatura informações sobre planejamento de fármacos com estudos *in silico* para conhecer os critérios importantes para a seleção do bioligante, e percebeu-se que a interação com a enzima é o critério mais relevante, pois o objetivo é planejar um fármaco com a atividade específica da inibição da MAO-B. Após a seleção do ligante, compreendeu-se que o auxílio de um especialista na área de síntese era considerável, portanto, para as modificações foi sugerido a retirada do grupo glicose e alteração nos radicais para tornar as moléculas mais lipossolúveis, para assim melhorar as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas.

Para o estudo de atividade e toxicidade *in vivo*, foram realizadas diversas tentativas para padronizar a metodologia de indução da DP no modelo animal Zebrafish, em que consistiu alteração da via de administração, das doses de neurotoxina, e metodologia para a

administração dessas doses. Apesar das metodologias utilizadas serem baseadas em estudos já realizados, não foi possível obter o padrão da indução da DP no Zebrafish, no entanto, foi possível realizar o ensaio de toxicidade aguda segundo o OECD (2018). Contudo, espera-se que futuramente seja possível padronizar a indução da DP na Universidade Federal do Amapá e assim testar a PMC3, em modelo animal Zebrafish com DP induzida, obter o resultado positivo para a inibição da MAO-B e, conseqüentemente, apresentar um possível candidato a fármaco para o tratamento da Doença de Parkinson.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP**

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 28 de agosto de 2018, o parecer referente ao protocolo nº. **013/2018** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado **"PLANEJAMENTO DE PROTÓTIPOS CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON: AVALIAÇÃO *in silico* E *in vivo*"** coordenado por **BIANCA LIFFEY BRITO MARINO**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 28 August 2018, the final decision about the Protocol **013/2018** and certify that the research project entitled **"PLANEJAMENTO DE PROTÓTIPOS CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON: AVALIAÇÃO *in silico* E *in vivo*"** coordinated by **BIANCA LIFFEY BRITO MARINO**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 28 de agosto de 2018

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
Rod. Juscelino Juscelino Kubitschek, km 02 – Campus Marco Zero,
Macapá - AP, 68903-419 email: farmacos@unifap.br
Fone (96)4009-2907

Anexo 2 – Normas de publicação dos respectivos periódicos

Normas da revista Mini-Reviews in Medicinal Chemistry (Artigo 1)

1.1.1.1 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.

1.1.1.1.1 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.**

1.1.1.1.2 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)

1.1.1.1.2.1 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.

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

1.1.1.1.2.2 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.

1.1.1.1.2.3 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 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.

1.1.1.1.2.4 Graphical Abstract

A graphic should be included when possible 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.

1.1.1.1.2.5 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.

1.1.1.1.2.6 Text Organization

The main text should begin on a separate page and should be divided into separate sections. The manuscript 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 Acknowledgements and Reference sections. The Review Article should mention any previous important recent and old 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.

The manuscript style must be uniform throughout the text and 10 pt Times New Roman fonts 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 Methods 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 Methods 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.

RESULTS

The important and main findings of the study should come first in the Results Section. The tables, figures and references should be given in sequence to emphasize the important information or observations related to the research. The repetition of data in tables and figures should be avoided. 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.

Authentication of Cell Lines

The NIH acknowledges the misidentification and/or cross-contamination of cell cultures e.g. HeLa cells being used in a research study as a serious problem. In order to ensure that

validation of the work and proper utilization of resources. It is a prerequisite that correct reagents be used in studies dealing with established human (tumor) cell lines that have been cultured for more than 4 years up to the date of submission of the manuscript. Cell lines such as short-term cultures of human tumors, murine cell lines (as a catalog of DNA profiles is not yet available) and tumor cell lines established in the course of the study that is being submitted, are presently exempt from this rule. To minimize the risk of working with misidentified and/or contaminated cell lines, tests such as isoenzyme analysis, karyotyping/cytogenetic analysis and, more recently, molecular techniques of DNA profiling may be carried out to authenticate cell cultures. These tests may help confirm or establish the identify profile for a cell line. Bentham Science recommends that all cell lines be authenticated prior to submitting a paper for review. Authors are therefore required to provide authentication of the origin and identity of the cells by performing cell profiling either in their own laboratory or by outsourcing an approved laboratory or cell bank. Authentication is required when a new line is established or acquired, before freezing a cell line, if the performance of the line is not consistent or results are unexpected, if using more than one cell line, and before publication of the study.

The cell lines profile should be cross-checked with the profile of the donor tissue of other continuous cell lines such as provided by the authentic data bank such as DSMZ (www.dsmz.de/fp/cgi-bin/str.html), ATCC® (https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms.aspx) etc.

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).

1.1.1.1.2.7 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.

1.1.1.1.2.8 Supportive/Supplementary Material

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.

Published/reproduced material should not be included unless you have obtained written permission from the copyright holder, which must be forwarded to the Editorial Office in case of acceptance of your article for publication.

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.

1.1.1.1.3 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.

Normas da revista ChemMedChem (Artigo 2)

Title

Author(s)^[b] and Corresponding Author(s)^{*[a]}

Dedication ((optional))

[a] Title(s), Initial(s), Surname(s) of Author(s) including Corresponding Author(s)
Department
Institution
Address 1
E-mail:
[b] Title(s), Initial(s), Surname(s) of Author(s)
Department
Institution
Address 2

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document. ((Please delete this text if not appropriate))

Abstract: Insert abstract text here. ((Abstracts should be 800-1000 characters in length excluding spaces. Please ensure your abstract is written so that it can be read in isolation (i.e., in an abstracting service such as PubMed), with all abbreviations defined.))

Introduction

Main Text Paragraph.

Results and Discussion

Main Text Paragraph.

((Insert Scheme here. **Note:** Please do **not** combine scheme and caption in a textbox or frame.))

Scheme 1. Scheme Caption.

Main Text Paragraph.

((Insert Figure here. **Note:** Please do **not** combine figure and caption in a textbox or frame.))

Figure 1. Figure Caption.

Main Text Paragraph.

Table 1. Table Caption. ((Note: Please do not include the table in a textbox or frame))				
Head 1 ^[a]	Head 2	Head 3 ^[b]	Head 4 ^[c]	Head 5
Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Column 5
Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Column 5

[a] Table Footnote. [b] ...

Conclusion

Main Text Paragraph.

Experimental Section

Experimental Details.

Acknowledgements ((optional))

Acknowledgements Text.

Keywords: keyword 1 • keyword 2 • keyword 3 • keyword 4 • keyword 5

- [1] ((Reference 1, Example for Journals:)) a) A. Author, B. Coauthor, *ChemSusChem***2008**, 1, 1-10; b) A. Author, B. Coauthor, *Angew. Chem.***2006**, 118, 1-5; *Angew. Chem. Int. Ed.***2006**, 45, 1-5.
- [2] ((Reference 2: Example for Books:)) J. W. Grate, G. C. Frye in *Sensors Update, Vol. 2* (Eds.: H. Baltes, W. Göpel, J. Hesse), Wiley-VCH, Weinheim, **1996**, pp. 10-20.
- [3] ...