



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS PARNAÍBA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

LUIZ FERNANDO BARBOSA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *in silico* DE ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE**

**PARNAÍBA
2023**

LUIZ FERNANDO BARBOSA DA SILVA

AVALIAÇÃO *in silico* DE ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE

Trabalho de Conclusão de Curso (monografia)
apresentado como exigência parcial para obtenção
do diploma do Curso de Licenciatura em Química
do Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Piauí. Campus Parnaíba.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Buana Carvalho de
Almeida.

PARNAÍBA
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Luiz Fernando Barbosa da

S586a Avaliação in silico de alcaloides B-carbolínicos como potenciais
inibidores da acetilcolinesterase / Luiz Fernando Barbosa da Silva. —
2023.
58 f.:il.color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) –
Instituto Federal do Piauí, Campus Parnaíba, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Buana Carvalho de Almeida.

1.Química. 2.Produutos naturais. 3.Doença de Alzheimer. I.Título.

CDD - 540

Elaborado por Micheline Angélica Aragão Gouveia CRB 3/1244

LUIZ FERNANDO BARBOSA DA SILVA

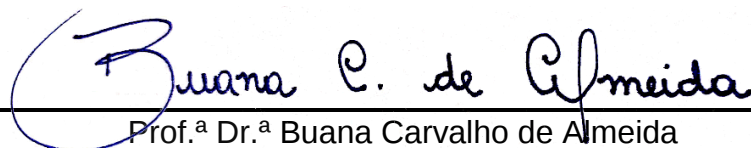
AVALIAÇÃO *in silico* DE ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE

Trabalho de Conclusão de Curso (monografia)
apresentado como exigência parcial para obtenção
do diploma do Curso de Licenciatura em Química
do Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Piauí. Campus Parnaíba.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Buana Carvalho de
Almeida.

Aprovado em: 16 / 01 / 2023

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Buana Carvalho de Almeida

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI) – *campus*
Parnaíba



Prof. Dr. Bartholomeu Araújo Barros Filho

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI) – *campus*
Parnaíba



Prof.^a Dr.^a Pauline Sousa dos Santos

Centro Universitário Maurício de Nassau (UNINASSAU) – *campus* Parnaíba

Aos amigos e família.

AGRADECIMENTOS

A minha amada mãe, Glauciana Torres Barbosa, por todo amor, carinho, apoio e paciência durante a vida e minha jornada acadêmica, muito obrigado por ser o exemplo de força e dedicação que busco me inspirar.

A minha querida tia, Marcia Torres Barbosa, que sempre me apoiou e incentivou a buscar mais conhecimento desde sempre, servindo de espelho para minha vida acadêmica e pessoal.

Aos meus avós, aos quais eu chamo carinhosamente de pai e mãe, Manoel Barbosa e Maria Célia Torres Barbosa, muito obrigado por todo o amor, cuidado e carinho que tiveram na minha criação, que com certeza contribuíram para me tornar a pessoa que sou hoje.

A toda a minha família que contribuiu de forma direta no meu desenvolvimento.

A minha querida orientadora Prof.^a Dr^a. Buana Carvalho de Almeida, que me acolheu como orientando e aluno de pesquisa. Muito obrigado pela excelente orientação, inspiração profissional, por todo conhecimento e pela oportunidade de aprender com uma pessoa incrível, espero um dia ser um pouco da pessoa inspiradora que você é.

Ao Prof. Dr. Bartholomeu Araújo Barros Filho, por ser um modelo de professor. Muito obrigado por estar disponível nos momentos de dúvidas.

À Prof.^a Dr^a. Ana Maria Athayde Uchôa Thomaz, por todos os ensinamentos passados desde o primeiro período até o final do curso. Muito obrigado por todo o companheirismo durante o curso e por ter tido paciência com a nossa turma enquanto coordenadora do curso, foi excelente ter você como companheira e amiga durante os tempos difíceis.

A todos os professores do IFPI – *campus* Parnaíba que estiveram comigo nessa jornada e que compartilharam comigo os seus ensinamentos e histórias de vida. Em especial para a Prof.^a Dr^a. Márcia Valéria Silva Lima, Prof. Dr. Haroldo Luís de Sousa Neres, Prof.^a Dr^a. Evânia Carvalho dos Santos e Prof.^a Dr^a. Janiciara Botelho Silva, muito obrigado a todos pela inspiração de como ser um professor e pesquisador, com certeza, ao exercer a profissão, serão as minhas principais referências.

Aos servidores técnicos-administrativos e terceirizados do Instituto, que permite o pleno funcionamento do campus.

A Tia Lu que foi um amiga da nossa turma e sempre apoiou e demonstrou carinho por todos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – *campus* Parnaíba, por todos os anos de estudos, desde o Ensino Médio até o Ensino Superior, obrigado por todos esses anos de excelência de ensino.

A todas as minhas amizades construídas ao longo desses quatro anos de graduação, a toda a minha turma sempre se mantendo unida, foram todas essas amizades que fizeram todo esse período de graduação valer a pena, muito obrigado a toda a turma de 2019.1 que me acompanhou até aqui, Expedito, Mairon, Isaias, Bianca, Warley, Thalia, Bia, Bianca, Rafa, Cibebe, Lucas e todo mundo, com certeza a melhor turma.

Às minhas melhores amigas, Duda e Vitória, que me apoiam e me aguentam há anos, muito obrigado por estarem sempre comigo. Amo vocês.

A todos que contribuíram de forma direta e indiretamente para o meu crescimento, muito obrigado por tudo.

“Existem coisas que você não consegue enxergar se não mudar seu ponto de vista...”

Trafagar D. Water Law

RESUMO

A Doença de Alzheimer é doença neurodegenerativa progressiva e que afeta milhões de idosos em todo o mundo, sendo a forma mais comum de demência. A hipótese colinérgica, se baseia na diminuição da síntese do neurotransmissor acetilcolina, comprometendo a função colinérgica. Assim, uma estratégia terapêutica adotada para esta hipótese, é o uso de fármacos que atuem na inibição da acetilcolinesterase, aumentando os níveis de acetilcolina, favorecendo a neurotransmissão. O presente trabalho tem como objetivo realizar o estudo de alcaloides β -carbolínicos como inibidores da acetilcolinesterase, através estudos de docking molecular e análise de suas propriedades farmacocinéticas. Para isso, foram analisados 92 alcaloides de 14 subclasses diferentes. Dentre eles, o alcaloide penipalina B demonstrou interações importantes com o subsítio aniônico periférico da AChE, evidenciadas pelos estudos de *docking*, sendo observada as interações com os resíduos de TYR337 e TRP286, já descritos na literatura como sendo importantes para a inibição dessa enzima. Ademais, obteve pontuação *score* acima dos fármacos galantamina, fisostigmina e huperzina A, indicando que esse alcaloide possui afinidade relevante com a com a enzima. O estudo farmacocinético evidenciou características importantes para a sua atuação como fármaco, possuindo alta probabilidade de ser permeável pela barreira hematoencefálica e facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal, o que é desejável para fármacos que atuem como inibidores da AChE. Além disso, a penipalina B não se mostrou inibidor da enzimas CYP. Com relação aos preditores de toxicidade como, baixo risco de inibição da hERG e resultado negativo para carcinogenicidade em ratos e camundongos também foram observados para esse alcaloide. Portanto, de acordo com os dados obtidos, a penipalina B se torna o inibidor mais promissor, dentre os ligantes estudados, devido às suas interações importantes com resíduos importantes da AChE e de suas propriedades farmacocinéticas.

Palavras-chave: Produtos Naturais; Doença de Alzheimer; ADMET; *Docking* molecular.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease that affects millions of elderly people worldwide and is the most common form of dementia. The cholinergic hypothesis is based on the decrease in the synthesis of the neurotransmitter acetylcholine, compromising the cholinergic function. Thus, a therapeutic strategy adopted for this hypothesis is the use of drugs that act in the inhibition of acetylcholinesterase, increasing levels of acetylcholine, and favoring neurotransmission. The present work aims to study β -carboline alkaloids as acetylcholinesterase inhibitors through molecular docking studies and analysis of their pharmacokinetic properties. To this end, 92 alkaloids from 14 different subclasses were analyzed. Among them, the alkaloid penipalin B showed essential interactions with the peripheral anionic subsite of AChE, evidenced by docking studies, being observed the interactions with residues TYR337 and TRP286, already described in the literature as being important for the inhibition of this enzyme. Additionally, it scored higher than the drugs galantamine, physostigmine, and huperzine A, indicating that this alkaloid has a relevant affinity with the enzyme. The pharmacokinetic study evidenced important characteristics for its action as a drug, possessing a high probability of being permeable by the blood-brain barrier and easily absorbed by the gastrointestinal tract, which is desirable for drugs that act as AChE inhibitors. Furthermore, penipalin B was not shown to be an inhibitor of CYP enzymes. Regarding toxicity predictors such as the low risk of hERG inhibition and a negative result for carcinogenicity in rats and mice were also observed for this alkaloid. Therefore, according to the data obtained, penipalin B becomes the most promising inhibitor among the ligands studied due to its essential interactions with important residues of AChE and its pharmacokinetic properties.

Keywords: Natural Products; Alzheimer's Disease; ADMET; Molecular Docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação entre um cérebro saudável e um cérebro afetado pelo Alzheimer.	18
Figura 2 - Formação e degradação da acetilcolina.	19
Figura 3 - Clivagem da PAA pela via não-amiloidogênica e via amiloidogênica.	20
Figura 4 - Mecanismo de degradação da ACh pela AChE	21
Figura 5 - Estrutura da AChE (PDB: 4EY7), cadeia A. A superfície azul corresponde ao sítio ativo.	22
Figura 6 - Estruturas da tacrina e do donepezil.	23
Figura 7 - Requisitos básicos para a realização do docking molecular.	24
Figura 8 - Contribuição das CYP450 ao metabolismo oxidativo de fármacos.	26
Figura 9 – Estruturas das unidades características dos alcaloides β -carbolínicos.	28
Figura 10 - Esquema da rota biossintética de um alcaloide β -carbolínico.	28
Figura 11 - Esquema do método de redocking.	31
Figura 12 - Visualização da cavidade do sítio ativo do alvo. A esfera destacada em vermelho representa o raio centrado no sítio de ligação.	33
Figura 13 - Resultado de redocking do donepezil. Sobreposição do ligante co-cristalizado (branco) com o ligante após a redocagem (verde).	34
Figura 14 - Comparação das interações entre o donepezil redocado (A) e donepezil co-cristalizado (B).	35
Figura 15 – Interações da fisostigmina com o alvo molecular 4EY7.	36
Figura 16 - Interações da galantamina com o alvo molecular 4EY7.	36
Figura 17 - Interações da huperzina A com o alvo molecular 4EY7.	37
Figura 18 - Estrutura do alcaloide B138 (Penipalina B).	48
 Gráfico 1 - Parâmetros de absorção dos ligantes de referência apresentados no modelo BoiledEgg.	 38
Gráfico 2 - Parâmetros de absorção dos alcaloides β -carbolínicos apresentados no modelo BoiledEgg.	43

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Subclasses e quantidade das moléculas usadas como ligantes	30
Tabela 2 - Clearance dos fármacos de referência.	39
Tabela 3 - Valores de scores obtidos pelo programa GOLD usando a função GoldScore.	42
Tabela 4 - Alcaloides com melhores perfis ADMET	45
Tabela 5 - Parâmetros de clearance total dos alcaloides β -carbolínicos.	46
 Quadro 1 - Estruturas 2D dos inibidores de referência utilizados. Galantamina (A), fisostigmina (B), huperzina A (C),.....	32
Quadro 2 - Estrutura dos alcaloides B121(A), B82(B) e B132(C), que obtiveram os maiores score entre os ligantes.....	40
Quadro 3 – Demais alcaloides que obtiveram scores maiores que galantamina, fisostigmina e huperzina A.	40
Quadro 4 - Interações do alcaloide B138 (PENIPALINA B) com a AChE.	47

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação, Toxicidade
BHE	Barreira hematoencefálica
CCDC	<i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
CYP450	Citocromo P450 oxidase
ChAT	Colina acetiltransferase
DA	Doença de Alzheimer
DM	<i>Docking</i> molecular
EM	Emaranhado Neurofibrilares
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GP-p	Glicoproteína-p
hAChE	Acetilcolinesterase humana
hERG	<i>Human Ether-a-go-go-Related Gene</i>
PAA	Proteína precursora amiloide
PAS	Sítio aniônico periférico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PS	Placas senis
TGI	Trato gastrointestinal
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i>
βA	β-amiloide

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER: ASPECTOS GERAIS.....	17
2.1.2 Hipótese colinérgica	18
2.1.3 Hipótese da cascata amiloide	19
2.2 A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	20
2.2.1 A estrutura cristalográfica e o sítio ativo da AChE	21
2.2.2 Inibidores de AChE	22
2.3 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	23
2.3.1 Docking molecular	24
2.3.2 Avaliação <i>in silico</i> das propriedades ADMET de moléculas bioativas.....	25
2.4 ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 TIPO DE PESQUISA.....	30
4.2 PROCEDIMENTO DA PESQUISA.....	30
4.2.1 Seleção do receptor e dos ligantes	30
4.2.2 Preparo dos ligantes	31
4.2.3 Validação do protocolo de <i>docking</i> por <i>redocking</i>	31
4.2.4 Docking de fármacos conhecidos	32
4.2.5 Docking molecular do receptor e ligantes selecionados.....	32
4.2.6 Avaliação das propriedades ADMET dos ligantes	33
4.3 TRATAMENTO DE DADOS	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE DOCKING POR REDOCKING.....	34
5.2 DOCKING E INTERAÇÕES DOS FÁRMACOS CONHECIDOS.....	35
5.2.1 Propriedades ADMET dos fármacos de referência	37
5.3 DOCKING DOS ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS	39
5.3.1 Propriedades ADMET dos alcaloides β-carbolínicos.....	43
5.3.2 Interações dos melhores resultados dos alcaloides β-carbolínicos	47

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população nos países desenvolvidos é um fator que se relaciona com o aumento dos casos de indivíduos afetados com alguma doença degenerativa (PEREIRA, 2012; COELHO, 2013). A Doença de Alzheimer (DA) tem uma maior prevalência dentro das doenças neurodegenerativas, afetando cerca de 30 milhões de pessoas, no entanto, espera-se que esse número quadruplique até o ano de 2050 (JUCKER & WALKER, 2011; CALLAWAY, 2012). Dados da Alzheimer's Association (2022), mostram que, só nos Estados Unidos, cerca de 6 milhões de americanos vivem com Alzheimer. É importante ressaltar também que, durante o período da pandemia em 2020, o número de pessoas afetadas pela doença cresceu em 17% (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022).

Devido ao aumento da expectativa média de vida, a idade é o principal fator de risco associado a DA, portanto, a população idosa é a mais afetada por essa doença (COIMBRA, 2016). Outros fatores de risco para o desenvolvimento da doença podem ser, genes de risco/suscetibilidade, gênero feminino, histórico familiar, síndrome de Down, doença vascular, diabetes, tabagismo e obesidade (SILVA, 2016). Os sintomas se baseiam na perda de memória a curto prazo e na dificuldade para se comunicar. Além disso, o indivíduo pode apresentar alterações na personalidade confusão, raiva, tristeza e falta de concentração (SEIDL, 2014).

Até o momento, não existe uma cura para o Alzheimer, porém, existem esforços da comunidade científica para a procura de novos fármacos que possam atuar no tratamento terapêutico e melhora na qualidade de vida do indivíduo afetado (VILELA, 2018). Como a DA tem a causa exata desconhecida, existem duas principais hipóteses para a causa: a hipótese colinérgica, atrelada a enzima acetilcolinesterase e a hipótese da cascata amiloide, ligada à β -secretase. Uma importante alternativa terapêutica atualmente, se baseia na busca de fármacos que podem inibir a acetilcolinesterase (SEIDL, 2014).

O desenvolvimento de novos fármacos busca, principalmente, identificar novas moléculas bioativas que podem atuar no tratamento de doenças. Dessa forma, ao descobrir uma patologia, a busca de uma nova molécula bioativa se inicia no planejamento racional do fármaco, seja ele uma molécula natural ou sintética (SOUZA, 2015; MAIA et al., 2020).

Assim, para que um novo fármaco seja introduzido no mercado, são necessários anos de pesquisas, integração de várias áreas do conhecimento, aprovação em testes pré-clínicos e clínicos e investimentos que podem chegar a milhões de dólares (TAVARES, 2009). Para que isso seja diminuído, o uso de ferramentas computacionais pode ser utilizado em fases iniciais do planejamento, indicando a interação da molécula e do alvo molecular. O *docking molecular* é uma técnica que se destaca, pois é possível realizar uma triagem virtual para prever as orientações e conformações prováveis entre um ligante alvo, gerando uma estimativa da atividade do ligante com a proteína (LIMA, 2019). Dessa forma, com essa ferramenta, é possível analisar uma série de potenciais compostos bioativos e filtrar aqueles que se apresentarem como promissores, acelerando a fase inicial do planejamento do fármaco (BARROS, 2015).

Entre os produtos naturais, os alcaloides são considerados compostos promissores para o tratamento da DA (KONRATH et al., 2013). Com a identificação do alcaloide galantamina como um potente inibidor da AChE (NG et al., 2015), a procura de novos alcaloides como inibidores, tem sido muito estudada no campo da química de produtos naturais (LIMA, 2019). Os alcaloides β -carbolínicos harmalina e harmina apresentaram uma ação inibitória frente a esta enzima (ZHAO et al., 2013; LI et al., 2018). Assim, os alcaloides vem sendo um importante alvo de pesquisas na descoberta de novos compostos bioativos, levando em conta a hipótese colinérgica (PARK, 2010).

Portanto, a busca de potenciais moléculas bioativas que podem agir como inibidores da acetilcolinesterase, sustenta a relevância de pesquisas com produtos naturais, focadas na classe dos alcaloides, que contribuem para o desenvolvimento de novas alternativas no tratamento terapêutico para a DA.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

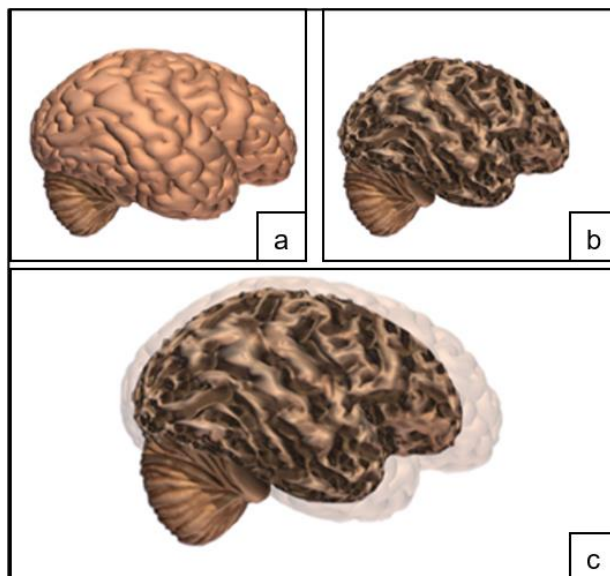
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER: ASPECTOS GERAIS

De acordo com Alzheimer's Disease International (2022), a demência é uma síndrome que tem como característica a diminuição das funções cognitivas, afetando a memória, raciocínio, pensamento, orientação, compreensão, linguagem, capacidade de aprendizagem e julgamento. A doença de Alzheimer, a doença de Huntington, a doença de Parkinson são algumas doenças em que a demência pode surgir como um sinal clínico (SQUIRE et al., 2008). A DA destaca-se correspondendo por mais de 50% dos casos de demência (LIMA, 2014).

O primeiro caso da DA foi relatado em 1901 pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer (1864-1915) em uma mulher de 51 anos, que apresentava redução progressiva da memória a curto prazo e a sua condição rapidamente piorou gravemente para demência severa (SILVA, 2016). A DA é uma doença neurodegenerativa que acomete principalmente os idosos. Os sintomas mais comuns são: perda de memória, distúrbios na fala e comportamentais e disfunção cognitiva que, com o passar do tempo, se tornam cada vez mais graves (SOUZA et al., 2013).

De acordo com Videira (2015), a etiologia dessa doença não é conhecida totalmente, sendo o diagnóstico definitivo feito através da observação de marcadores biológicos que aparecem no cérebro dos indivíduos afetados. Macroscopicamente, o cérebro dos pacientes com Alzheimer apresenta uma atrofia acentuada das matérias branca e cinzenta, com degeneração de neurónios e sinapses. É possível ver a representação gráfica de um cérebro saudável (a), um cérebro afetado pela DA (b) e a sobreposição (c) dos dois cérebros mostrando a diferença de massa causada pela atrofia em decorrência da doença de Alzheimer, conforme a Figura 1.

Figura 1 - Comparação entre um cérebro saudável e um cérebro afetado pelo Alzheimer.



Legenda: a - Cérebro saudável;
 b - Cérebro afetado pela DA;
 c - Sobreposição dos dois cérebros;

Fonte: Adaptado de Alzheimer's Association (2022).

Microscopicamente, a DA é caracterizada pela presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares. As placas senis (PS), são agregados insolúveis e esféricos, derivados do peptídeo β -amiloide localizados no meio extracelular do sistema límbico (TORRES et al, 2012). São observados também, emaranhados neurofibrilares (EN), que são agregados que surgem nos interiores dos neurônios resultado do acúmulo da proteína Tau (LIMA, 2014).

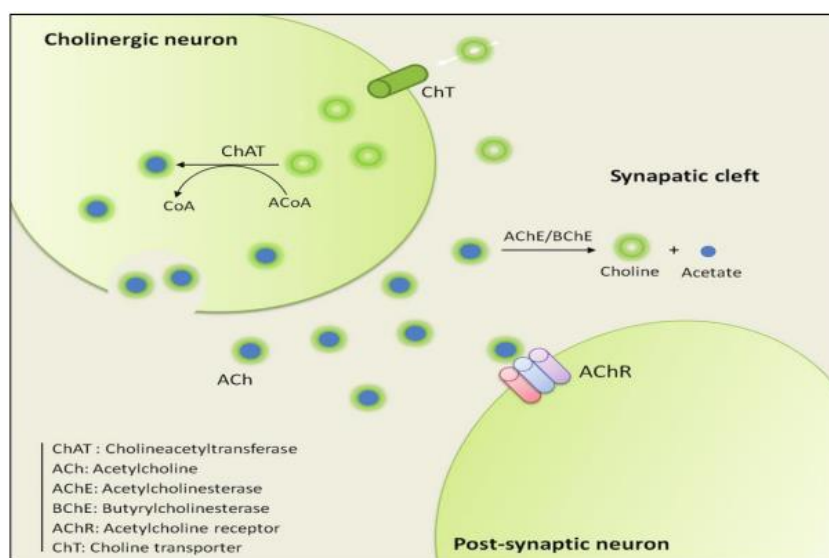
Portanto, existem duas principais hipóteses que tentam explicar o desenvolvimento dessa doença: a hipótese colinérgica e a hipótese da cascata amiloide (COSTA et al., 2019).

2.1.2 Hipótese colinérgica

A hipótese colinérgica se baseia no comprometimento dos neurônios colinérgicos e na síntese do neurotransmissor acetilcolina (ACh), comprometendo a função colinérgica, levando a disfunção cognitiva (SHARMA et al., 2020). Assim, os indivíduos afetados pela DA, apresentam uma diminuição drástica da síntese do neurotransmissor acetilcolina, levando à diminuição das funções sinápticas (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016).

Esse neurotransmissor é produzido pelos substratos colina, acetil-coenzima A e trifosfato de adenosina, pelo intermédio da enzima colina acetiltransferase (ChAT), e assim lançada na fenda sináptica e recebida pelos receptores de ACh. A neurotransmissão é interrompida pela hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetado (DIAS & RAUTER, 2015). A Figura 2 exibe o processo de formação e degradação da ACh.

Figura 2 - Formação e degradação da acetilcolina.



Fonte: Dias & Rauter (2015).

Assim, uma estratégia terapêutica adotada para esta hipótese, é o uso de fármacos que atuem na inibição da ação da AChE, para que seja possível o aumento do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica (DIAS & RAUTER, 2015).

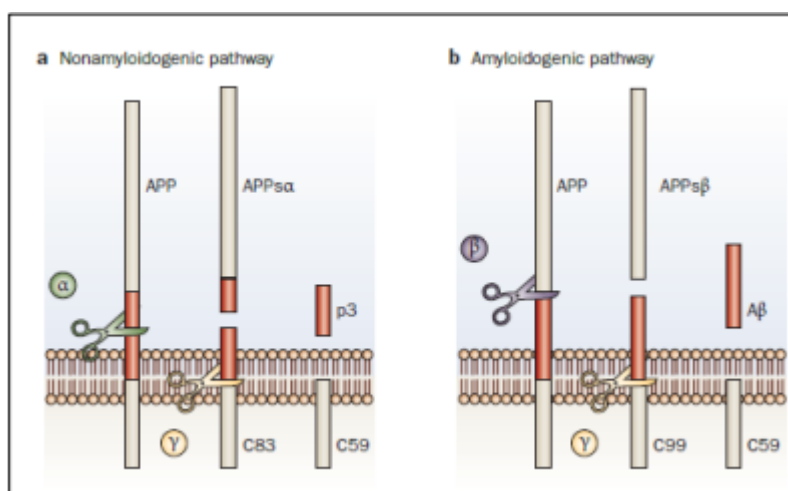
2.1.3 Hipótese da cascata amiloide

A hipótese da cascata amiloide leva em consideração o acúmulo do peptídeo β -amiloide (β A) no cérebro, formando placas e desencadeando o acúmulo de proteína Tau, inflamação, disfunção sináptica, perda neuronal e, por último, a demência (COIMBRA, 2016; SILVA, 2016). O peptídeo β A é um produto gerado a partir da clivagem da proteína precursora amiloide (PAA) pelas enzimas α -secretase, β -secretase e γ -secretase (GHOSH & OSSWALD, 2014). Essa clivagem pode ser por dois caminhos: via não-amiloidogênica e via amiloidogênica (COIMBRA, 2016). Pela via não-amiloidogênica (FIGURA 3a), a PAA é clivada pela α -secretase, na região extracelular, produzindo um fragmento solúvel (sAPP α) que sua vez é secretado no meio extracelular.

O fragmento resultante, preso na membrana, é clivado pela γ -secretase originando um fragmento p3. Dessa forma, a clivagem realizada pela α -secretase elimina a possibilidade da formação de agregados e placas, por não formar β A (COIMBRA, 2016; SILVA, 2016).

Pela via amiloidogênica (FIGURA 3b), a clivagem ocorre pela β -secretase, resultando na liberação de sAPP β para o meio extracelular e deixando um fragmento de 99 resíduos de aminoácidos preso na membrana. Esse fragmento é clivado pela γ -secretase originando o peptídeo A β (COIMBRA, 2016; SILVA, 2016).

Figura 3 - Clivagem da PAA pela via não-amiloidogênica e via amiloidogênica.



Legenda: a – via não-amiloidogênica;

b – via amiloidogênica;

Fonte: Coimbra (2016).

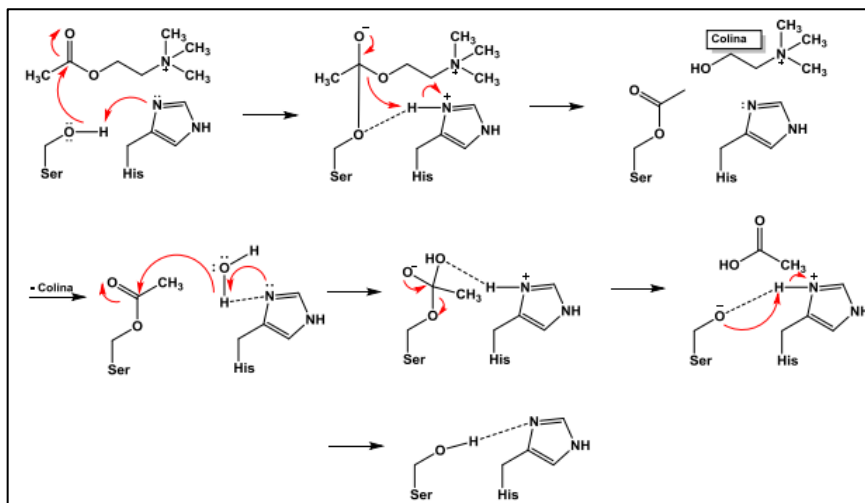
Tanto a via amiloidogênica, como a via não-amiloidogênica, ocorrem normalmente em indivíduos saudáveis. A DA surge devido a um descontrole da via amiloidogênica (ARBOR et al., 2016).

2.2 A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolinesterase é uma enzima que pertence a classe das serino-hidrolases e está envolvida no processo de transmissão colinérgica, interrompendo a neurotransmissão, degradando a acetilcolina em colina e acetato, sendo encontrada principalmente nas junções neuromusculares e nas sinapses cerebrais colinérgicas (FALCO et al., 2016; FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). A degradação do neurotransmissor ACh ocorre via reação de hidrólise em decorrência da tríade catalítica da enzima: Serina (SER), Histidina (HIS) e Glutamato (GLU) (ALMEIDA, 2014).

A hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE ocorre pelos resíduos de HIS, que atuam como um catalisador ácido-base, e da SER, atuando como um nucleófilo (TÕUGU, 2001). A figura 4 mostra o mecanismo da hidrólise da acetilcolina pelos resíduos do sítio ativo da enzima.

Figura 4 - Mecanismo de degradação da ACh pela AChE



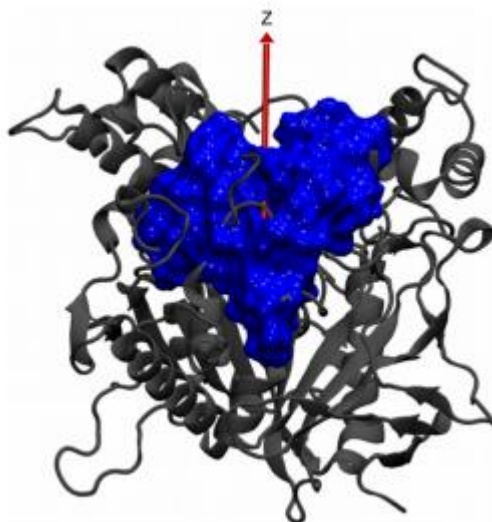
Fonte: TÕUGU (2001).

O par de elétrons da hidroxila do aminoácido serina da AChE ataca o carbono carbonílico da ACh e a histidina remove um próton da hidroxila. Posteriormente, a histidina protonada, doa um próton para a subunidade colina da ACh, que é então liberada deixando a serina acetilada, que por sua vez sofre hidrólise com o intermédio da água, atuando como nucleófilo. Por fim, o ácido acético é formado e o resíduo serina é regenerado (TÕUGU, 2001).

2.2.1 A estrutura cristalográfica e o sítio ativo da AChE

A primeira estrutura cristalográfica da AChE foi determinada em 1991, do organismo *Torpedo californica* (SUSSMAN et al., 1991). Posteriormente, estruturas cristalográficas do rato, *Drosophila* e do homem foram obtidas, sendo similares entre si (ALMEIDA, 2014). A cavidade do sítio ativo da AChE (FIGURA 5) é composta por vários subsítios: a tríade catalítica [SER203, GLU334, HSD447], sítio aniônico periférico (PAS) [ASP74, TYR124, SER125, TRP286, TYR337, TYR341], subsítio acila [TRP236, PHE295, PHE297, PHE338], sítio aniônico [TRP86, TYR133, GLU202, GLY448, ILE451], cavidade oxiânion [GLY121, GLY122, ALA204] (ALMEIDA, 2014).

Figura 5 - Estrutura da AChE (PDB: 4EY7), cadeia A. A superfície azul corresponde ao sítio ativo.



Fonte: KIAMETIS et al., (2017).

As interações entre a AChE e fármacos conhecidos, é caracterizada pela presença de interações π com resíduos aromáticos. Assim, interações do tipo empilhamento- π entre os resíduos aromáticos e grupos aromáticos dos inibidores, desempenham uma função muito importante nas relação receptor-ligante. Dessa forma, algumas interações são de extrema importância para o funcionamento dos fármacos aqui analisados. O TRP286 é responsável pela interligação para a transferência de moléculas em direção ao sítio ativo (ALMEIDA, 2014). Segundo Cheung et al., (2012), o resíduo de TYR337 tem sido reportado como importante para a inibição da acetilcolinesterase humana (hAChE), por atuar como uma porta oscilante e adotar várias conformações para interagir com o substrato. Dessa forma, esses resíduos desempenham um papel de bloqueadores da entrada e saída de substratos e produtos do sítio ativo da AChE, assim, a ligação de uma molécula a esses resíduos pode ser considerada de extrema importância funcional (DVIR et al., 2010; ALMEIDA, 2014).

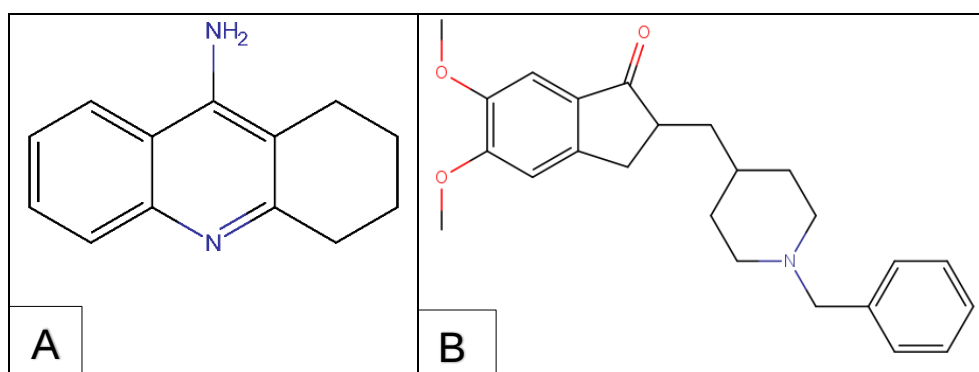
2.2.2 Inibidores de AChE

A tacrina (Cognex®) (FIGURA 6a) foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da DA, em 1993 (TUMIATTI et al., 2010). Esse fármaco é um inibidor reversível da AChE e estabelece fortes interações com o sítio da colina da enzima, mas não interage com o sítio periférico.

Esse fármaco apresenta interação do tipo empilhamento- π entre o anel quinolínico da tacrina e o anel indólico do TRP84. Porém, esse fármaco foi descontinuado devido a sua hepatotoxicidade e por causar uma série de efeitos colaterais, incluindo: náusea, vômito, tontura, diarreia, convulsões e desmaios (ALMEIDA, 2011; ALMEIDA, 2014).

O donepezil (Aricept®) (FIGURA 6b) foi desenvolvido com o objetivo de superar os efeitos secundários da tacrina, e foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1997 (QUINTANOVA, 2013). Ele é um inibidor reversível da AChE baseado no anel de piperidina. A interação com o sítio de ligação ocorre com o grupo benzílico do inibidor com o grupo indol do TRP84 da cavidade enzimática, não interagindo diretamente com a tríade catalítica da enzima (ALMEIDA, 2014).

Figura 6 - Estruturas da tacrina e do donepezil.



Legenda: a - Estrutura da tacrina;

b - Estrutura do donepezil;

Fonte: Autoria própria (2022).

2.3 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Ao decorrer da história, os processos da indústria farmacêutica são marcados por grandes avanços devido às inovações científicas e tecnológicas. Os modelos tradicionais de descobertas de novas moléculas bioativas passaram por transformações, dando lugar a novas formas de desenvolvimento (CAPRINO, 2006).

Tradicionalmente, o desenvolvimento de novos fármacos, desde a sua concepção à sua introdução ao mercado são necessárias várias fases de planejamento e investimento de anos em pesquisa e milhões de dólares. Dessa forma, podemos dizer que o desenvolvimento de novas moléculas ativas pode ser de grande

risco, uma vez que cerca de 79% de potenciais moléculas são descartadas ao longo do processo (DIMASI., et al 2003; MODA, 2007).

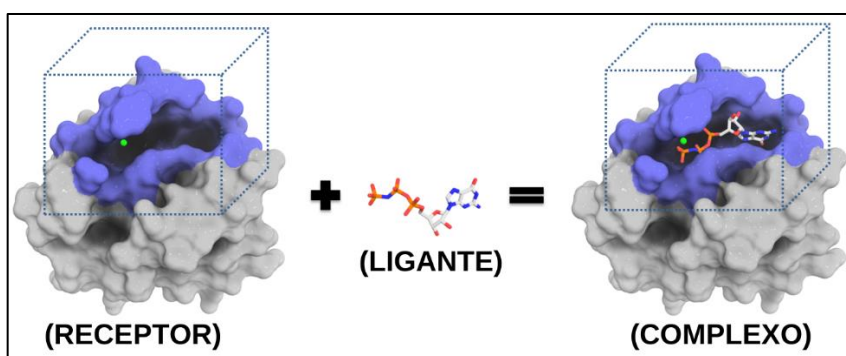
Assim, existe um grande interesse da indústria farmacêutica no uso de técnicas que minimizem o tempo e o custo de planejamento de novos candidatos à fármacos (MEEK et al., 2006; GELDENHUYS et al., 2006). Dessa forma, modelos *in silico* são utilizados nas iniciais desse processo para seleção de moléculas com um maior potencial de passar pelos estágios mais avançados (MODA, 2007).

2.3.1 *Docking* molecular

O *docking molecular* (DM) é uma técnica computacional que propicia a investigação das interações entre moléculas, e suas possíveis orientações, no interior do sítio ativo de biorreceptores (ROSADO, 2010). Essa técnica se baseia em várias tentativas de poses do ligante dentro do sítio ativo da macromolécula, para buscar a melhor conformação. Assim, uma vantagem dessa técnica é a identificação do modo de ligação de uma molécula no alvo, prevendo a sua afinidade (ALMEIDA, 2014). Para isso, o processo de *docking* depende do uso de um algoritmo de busca, para achar os possíveis estados configuracionais e conformacionais das soluções e das funções de pontuação (*score*), que permitem um ranqueamento dos posicionamentos do ligante na proteína (DEL CISTIA, 2010). Dessa forma, o uso do *docking molecular*, possui bastante relevância no planejamento de novos fármacos, pois fornece informações da interação ligante-macromolécula (BALLANTE & MARSHALL, 2016).

Para a realização do DM e avaliação da interação do complexo proteína-ligante, são necessárias as informações estruturais da proteína alvo, bem como a estrutura do ligante (ALMEIDA, 2018), conforme mostrado na figura 7.

Figura 7 - Requisitos básicos para a realização do *docking molecular*.



Fonte: Adaptado de DockThor (2022)

Dentre os programas que tem mostrado melhor acurácia na literatura, destaca-se o programa GOLD, que é um programa desenvolvido pela *Cambridge Crystallographic Data Centre – CCDC*, onde é possível o *docking* de moléculas com certos parâmetros definidos. Esse *software* utiliza algoritmo genético, para o tratamento do ligante, e cálculos de campo de força para ranquear os resultados de uma pontuação *score* (JONES et al., 1997). Essa pontuação pode ser de acordo com uma função *fitness* disponibilizada pelo próprio programa, dentre elas, GoldScore, ChemScore, ChemPLP e ASP, que podem ser utilizadas para ranquear as poses do ligante (CASTILHO, 2012). A função *GoldScore* é originalmente do programa GOLD, e pode ser calculada pelos termos:

$$\text{GoldScore} = S_{hb_{ext}} + 1,375_{vdW_{ext}} + S_{hb_{int}} + S_{vdW_{int}}$$

Onde $S_{hb_{ext}}$ é a pontuação da energia das ligações de hidrogênio proteína-ligante, $1,375_{vdW_{ext}}$ se trata da pontuação das energias de van der Waals proteína-ligante multiplicado por uma constante de correção, $S_{hb_{int}}$ é a contribuição para o ajuste devido a ligações de hidrogênio intramoleculares do ligante, e $S_{vdW_{int}}$ é a pontuação da tensão intramolecular do ligante (CASTILHO, 2012).

2.3.2 Avaliação *in silico* das propriedades ADMET de moléculas bioativas

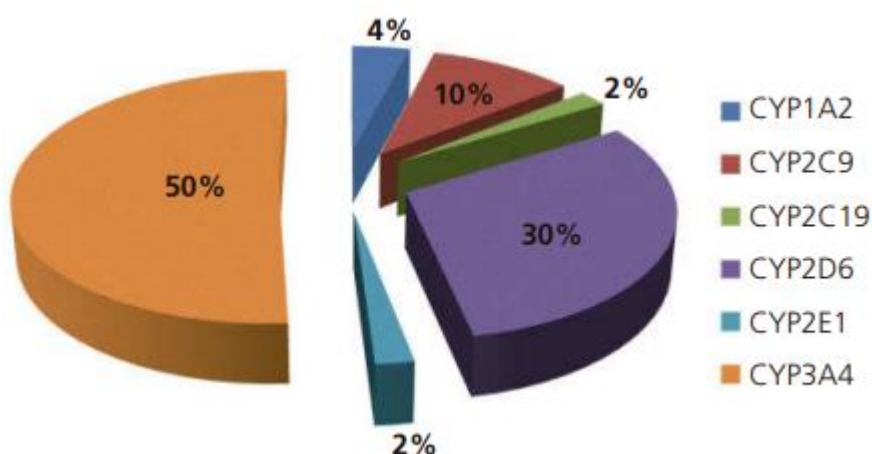
O estudo de propriedades farmacocinéticas dos candidatos a fármacos é de extrema importância no processo de planejamento, uma vez, que para que sejam observados os efeitos farmacológicos desejados, é necessário que aquele princípio ativo esteja disponível no organismo por um determinado tempo. Os parâmetros ADMET, (A) de absorção, (D) de distribuição, (M) de metabolismo, (E) de eliminação, e (T) de toxicidade são estudados nos estágios iniciais e nos refletem sobre a biodisponibilidade do fármaco (MODA, 2007).

Para um fármaco ser absorvido pelo organismo, ele deve ser dissolvido e solubilizado no trato gastrointestinal (TGI) e assim ser absorvido através da membrana intestinal (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003; MODA, 2007). Dessa forma, as propriedades de hidrosolubilidade e lipossolubilidade da molécula influenciam na absorção. Para que um fármaco seja absorvido, o ideal é ele possua um equilíbrio entre as duas propriedades, uma vez que a molécula precisará de uma lipossolubilidade razoável para permear as membranas lipídicas e deve ser hidrossolúvel suficiente para se dissolver no TGI.

O coeficiente de partição $\log P$, é o parâmetro usado para medir esse balanço, ele representa a razão entre a concentração da substância na fase orgânica (octanol) e sua concentração na fase aquosa, representando assim a passagem do meio extracelular para o meio intracelular da bicamada lipídica (BARREIRO et al., 2014). Outra propriedade importante, se diz a respeito à fármacos que atuam no SNC, dessa forma, eles precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) para poder atingir o seu alvo molecular (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003).

Após o fármaco ser absorvido, ele é metabolizado pelo fígado, facilitando a eliminação pela urina (LI, 2001). O metabolismo ocorre principalmente pela enzima citocromo P450 oxidase (CYP450), por reações oxidação, redução e hidrólise, levando a metabólitos mais hidrofílicos. Sete isoformas são responsáveis pelo metabolismo de cerca de 90% dos fármacos, são elas: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4. A principal isoforma é a CYP3A4, sendo a mais abundante no fígado, contribuindo com cerca de 50% com o metabolismo dos fármacos (DE GROOT, 2006; MODA, 2007) (FIGURA 8). Dessa forma, alguns fármacos podem atuar como inibidores de CYP450, diminuindo a capacidade catalítica dessas enzimas e assim, aumentando o tempo de meia vida e a concentração plasmática de fármacos, frequentemente resultando na incidência de efeitos adversos e/ou tóxicos (BARREIRO et al., 2014). Dada a possibilidade de toxicidade ou perda de eficácia terapêutica associada ao fenômeno de inibição dessas enzimas, a determinação de um fármaco ser um potencial inibidor, é de extrema importância para prever eventuais interações medicamentosas.

Figura 8 - Contribuição das CYP450 ao metabolismo oxidativo de fármacos.



Fonte: BARREIRO et al., (2014).

O papel do metabolismo, em linhas gerais, se faz no auxílio da depuração (do inglês *clearance*) do fármaco, contribuindo para evitar seu acúmulo indesejado no organismo, podendo ser depurados a partir do fígado (fármacos lipofílicos), denominada *clearance* hepática ou pelos rins (fármacos hidrofílicos) denominada *clearance* renal (BARREIRO et al., 2014). Em linhas gerais, o *clearance* pode ser entendido como a eficiência da eliminação de um fármaco.

Já a toxicidade é uma propriedade de extrema importância no desenvolvimento de um novo fármaco. Abordagens de predição *in silico* dessa propriedade utilizam dados experimentais em diferentes níveis celulares e moleculares, avaliando as interações de perigos potenciais aos componentes do sistema biológico (SINHA et al., 2019). Existem diversos ensaios clínicos para medir isso essa propriedade, porém, a toxicidade continua sendo uma propriedade mais imprevisível de um fármaco, pois alguns ensaios clínicos podem demonstrar que um determinado fármaco é considerado seguro, porém, em alguns casos, alguns são retirados do mercado tardiamente devido a alguma propriedade toxica não predita antes (LI, 2001). A hERG (*Human Ether-a-go-go-Related Gene*), é um gene que codifica uma subunidade do canal de potássio que está associada ao fluxo de íons de potássio nas células cardíacas. Esse controle é essencial para o funcionamento regular dos batimentos cardíacos (VANDENBERG et al., 2012). O bloqueio dessa subunidade pode alterar o funcionamento cardíaco e evoluir para uma arritmia letal (BRAGA et al., 2015).

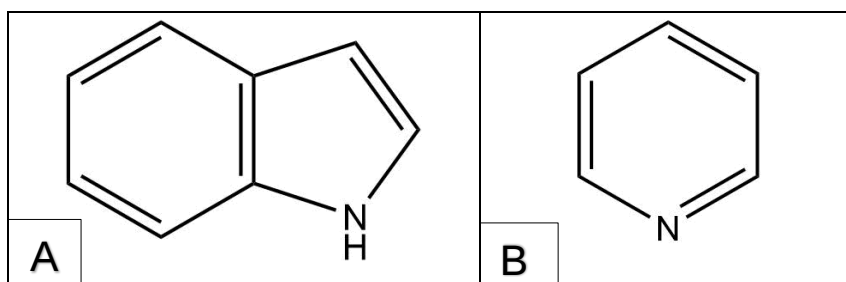
2.4 ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS

Os alcaloides são produtos do metabolismo secundário, são acumulados por cerca de 20% das espécies vegetais (MORENO et al., 1996; SANTOS, 2016). Essa classe de metabolitos é conhecida pela ação sobre o SNC (DE LUCA & ST PIERRE, 2000; INMAN et al., 2010). Dessa forma, muitos alcaloides são utilizados como protótipos para o desenvolvimento de fármacos. Possuem ação hipotensiva, antimalárica, antidiurética, alucinogênicas, antibactericida, anti-inflamatória, citotóxica, entre outras (SANTOS, 2016).

Os alcaloides β -carbolínicos constituem um grande grupo amplamente distribuídos na natureza, incluindo várias plantas, alimentos, seres vivos marinhos, insetos, mamíferos e tecidos humanos. Também podem ser conhecidos como alcaloides tipo harmala, a denominação se deve ao fato de que as primeiras estruturas

isoladas com este tipo de esqueleto foram obtidas a partir da espécie *Peganum harmala* (JIMENEZ et al., 2008). Estes alcaloides possuem uma distribuição bastante diversificada. São encontrados principalmente em plantas das famílias *Zygophyllaceae*, *Malpighiaceae*, *Passifloraceae*, *Leguminosae*, *Myristicaceae* e *Eleganceae*. A estrutura desses alcaloides é baseada no núcleo β -carbolina, o qual é composto por um anel tricíclico 9H-pirido pirido[3,4-b]indol pelo sistema de anéis pirido-indólico, caracterizado pela presença de núcleo indólico (FIGURA 9A), condensado ao anel piridínico (FIGURA 9B) (SIMÕES et al., 2007; DEWICK, 2009) podendo sofrer substituições ao longo da estrutura do núcleo, originando sua vasta diversidade estrutural (LIEW et al., 2014).

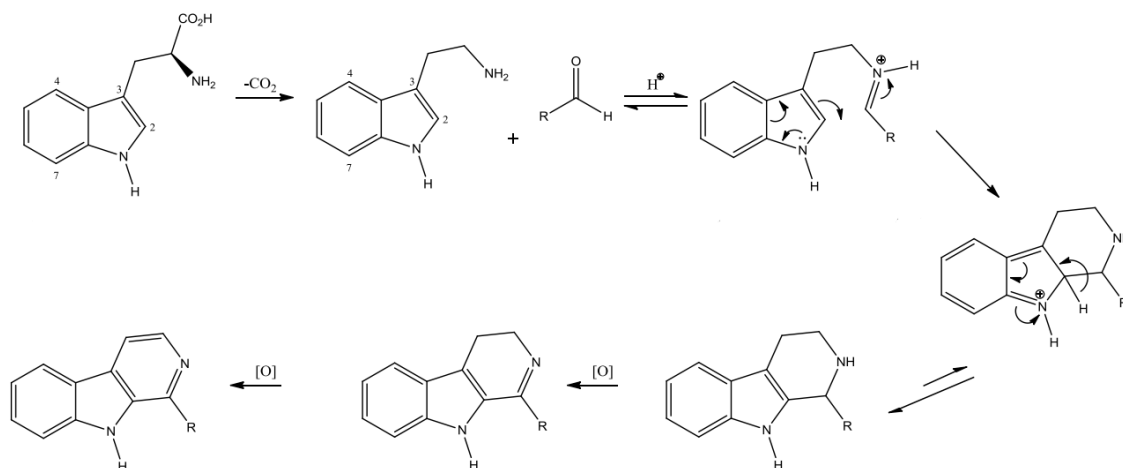
Figura 9 – Estruturas das unidades características dos alcaloides β -carbolínicos.



Fonte: Autoria própria (2022).

O esqueleto β -carbolínico se origina do triptofano que é descarboxilado, formando a unidade de triptamina, se condensando em um anel heterocíclico de seis membros a partir de uma reação do tipo Mannich/Pictet-Splenger (DEWICK, 2009; LAINE et al., 2014). (FIGURA 10).

Figura 10 - Esquema da rota biossintética de um alcaloide β -carbolínico.



Fonte: Santos (2016); Dewick (2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as interações de complexos formados entre a enzima acetilcolinesterase e alcaloides β -carbolínicos, através de estudos de *docking* molecular e análise de suas propriedades ADMET

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar a estrutura cristalográfica do alvo (AChE) no PDB.
- ✓ Selecionar os alcaloides β -carbolínicos que podem atuar como ligantes;
- ✓ Validar o protocolo de *docking* através do método de *redocking* da estrutura cristalográfica da AChE com o ligante co-cristalizado;
- ✓ Realizar o *docking* de fármacos conhecidos como referência;
- ✓ Avaliar as propriedades ADMT dos fármacos de referência;
- ✓ Realizar o *docking* molecular dos ligantes selecionados com a enzima;
- ✓ Avaliar as propriedades ADMET dos ligantes propostos;
- ✓ Classificar os resultados de *docking* de acordo com a pontuação *score* e perfil ADMET.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE PESQUISA

O presente trabalho tem natureza explicativa, esse tipo de pesquisa se preocupa em utilizar métodos experimentais, para a identificação de fatores que contribuem para a ocorrência dos fenômenos (GIL, 2017).

Além disso, de acordo com Gil (2017, p.47), a pesquisa experimental consiste, essencialmente, em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis capazes de influenciá-lo e definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto.

4.2 PROCEDIMENTO DA PESQUISA

4.2.1 Seleção do receptor e dos ligantes

As informações da estrutura cristalográfica da enzima alvo, acetilcolinesterase (AChE), foram retiradas da plataforma *Protein Data Bank* (PDB), sob o código de acesso 4EY7, sendo considerada, a resolução da estrutura ($R = 2,35 \text{ \AA}$), a presença do inibidor co-cristalizado, donepezil (E20), e o organismo (*Homo sapiens*). Para a seleção dos ligantes, foi feita uma busca na literatura de alcaloides β -carbolínicos de fontes naturais. Assim, as estruturas dos ligantes foram obtidas a partir do levantamento realizado por Santos (2016), onde são descritos alcaloides β -carbolínicos obtidos de fontes naturais, no período de 1996 a 2016, dessa forma, foram avaliadas 92 moléculas de 14 subclasses diferentes, conforme mostradas na tabela 1 a seguir:

Tabela 1 - Subclasses e quantidade das moléculas usadas como ligantes

Subclasse	Quantidade de moléculas
Tricíclicos básicos	10
Tricíclicos acila simples	11
Tricíclicos acila-amida	7
Tricíclicos indol	9
Tricíclicos quinolina	4
Tricíclicos imidazol	4
Cíclicos e Tetracíclicos	6

Dímeros	8
Dihidro- β -carbolina	6
Tetrahydro básicos	3
Tetrahydro acila	5
Tetrahydro cíclicos e tetracíclicos	9
Tetrahydro dímeros	4
Divergentes	6

Fonte: Autoria própria (2022).

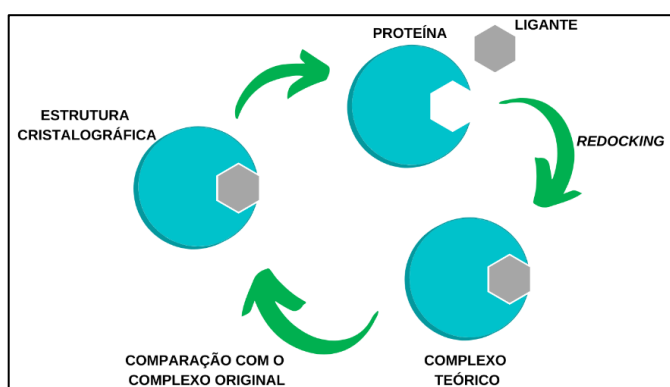
4.2.2 Preparo dos ligantes

As estruturas dos ligantes previamente selecionados foram desenhados no programa MarvinSketch v22.11.0, a predição dos estados de protonação foi obtida em pH 7,4 e os arquivos salvos na extensão mol2. Por fim, a geometria dos ligantes foram otimizadas pelo método de campo de força clássico MMFF94, no programa *Avogadro* v1.2.0.

4.2.3 Validação do protocolo de *docking* por *redocking*

O método de *redocking* (FIGURA 11) foi utilizado para validação dos protocolos de *docking*. O *redocking* consiste em comparar a posição do ligante que foi acoplado no sítio ativo da proteína, com a posição do ligante da estrutura cristalográfica original. O melhor protocolo é aquele que consegue recriar a orientação e conformação do ligante cristalográfico, com um RMSD (*Root Mean Square Deviation*) inferior ou igual a 2Å (CASTILHO, 2011). O método de validação seguiu-se conforme o manual *Pose Prediction* do programa *GOLD* (CCDC, 2020).

Figura 11 - Esquema do método de *redocking*.

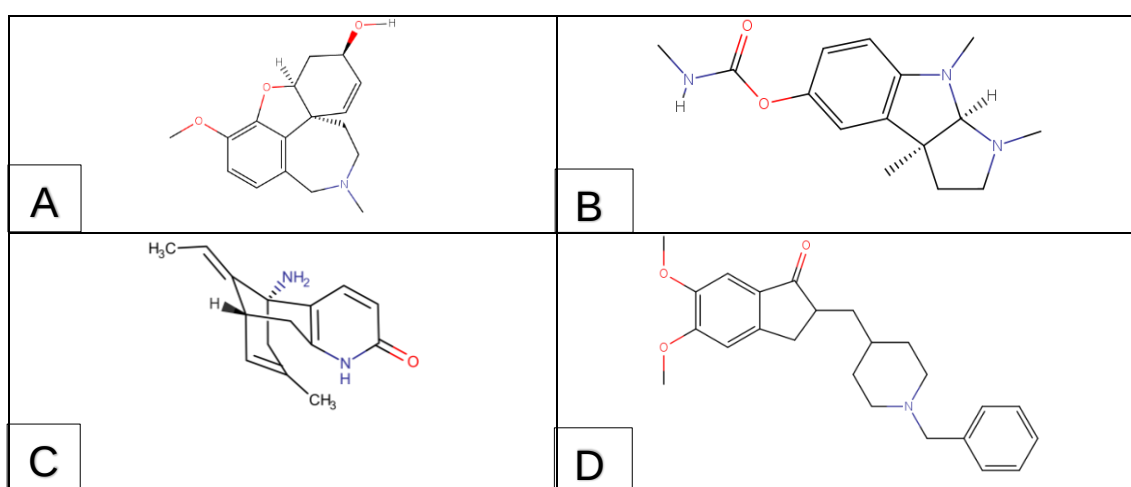


Fonte: Autoria própria (2022).

4.2.4 Docking de fármacos conhecidos

Foi realizado o *docking* de moléculas já conhecidas por atuar no tratamento da DA e usados como referências para a análise dos ligantes escolhidos. Para isso, foram escolhidos os fármacos: galantamina (A), fisostigmina (B), huperzina A (C), além do próprio ligante cristalográfico, donepezil (D), como inibidores de referência. As estruturas dos fármacos podem ser vistas no quadro 1. Todos os fármacos passaram pelo mesmo protocolo de *docking* que as moléculas selecionadas.

Quadro 1 - Estruturas 2D dos inibidores de referência utilizados. Galantamina (A), fisostigmina (B), huperzina A (C),

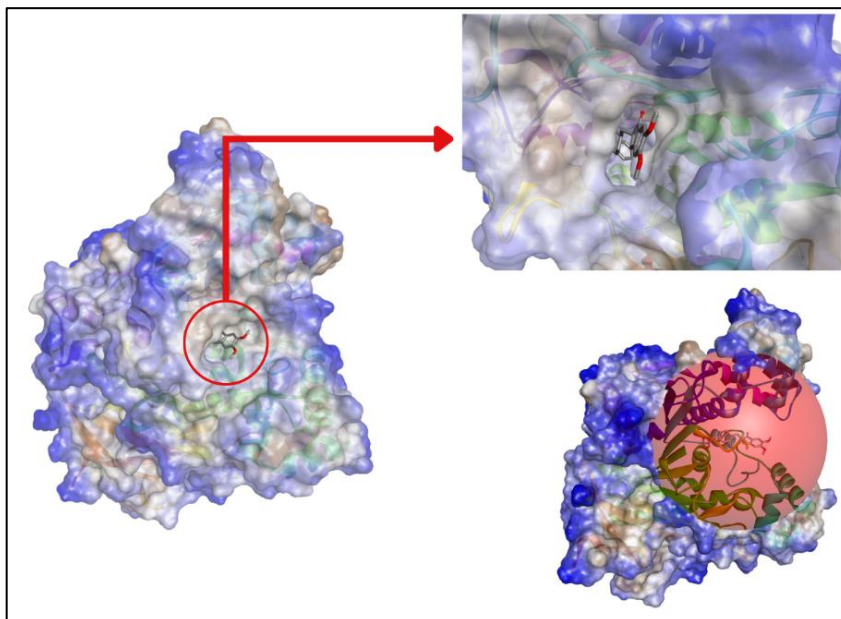


Fonte: Autoria própria (2022).

4.2.5 Docking molecular do receptor e ligantes selecionados

Com o ligante devidamente preparado e o protocolo validado, o *docking* foi realizado no programa GOLD v2022.1, com o receptor tratado de forma rígida. Para isso, as águas, ligantes e resíduos de cristalografia foram deletados e todos os hidrogênios da proteína adicionados, seguindo os parâmetros do próprio programa. Uma esfera de 20Å foi centrada no sítio ativo do alvo, nas coordenadas $x = -14,108464$, $y = -43,832714$ e $z = 27,669929$ (FIGURA 12) da cadeia A da estrutura cristalográfica, gerando 100 poses para cada ligante.

Figura 12 - Visualização da cavidade do sítio ativo do alvo. A esfera destacada em vermelho representa o raio centrado no sítio de ligação.



Fonte: Autoria própria (2022).

Para o ranqueamento das poses, foi empregada a função *GoldScore* e para *rescore*, a função *ASP*. Os parâmetros para o algoritmo genético, foram definidos de forma automática pelo programa com a eficiência de busca de 100%.

4.2.6 Avaliação das propriedades ADMET dos ligantes

Foi realizada a predição das propriedades ADMET das melhores soluções de *docking*. Dessa forma, as poses dos ligantes com maior pontuação *score* tiveram suas propriedades preditas através das plataformas online e gratuitas:

- ✓ **SwissADME®** (<http://swissadme.ch/index.php>): Para avaliar as propriedades de absorção, distribuição e metabolismo (DAINA et al., 2017);
- ✓ **pkCSM** (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>): Para avaliar o *clearance* total (PIRES et al., 2015);
- ✓ **PreADMETox®** (<https://preadmet.qsarhub.com/toxicity/>): Para avaliar a carcinogenicidade em ratos e camundongos e inibição da hERG.

4.3 TRATAMENTO DE DADOS

Os dados obtidos com a realização do presente trabalho foram analisados considerando sua natureza qualitativa e quantitativa. De início foi avaliado o *fitness score* de cada ligante buscando valores semelhantes ou maiores que os fármacos de referência. As melhores poses de cada subclasse de alcaloides foram organizadas em tabelas e classificadas de acordo com suas pontuações *GoldScore* e *ASP*. As propriedades ADMET foram preditas foram apresentadas no gráfico *BoiledEgg* e em tabelas.

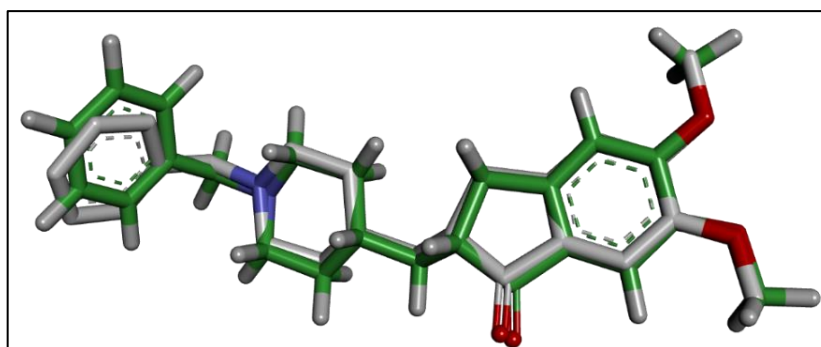
As interações mais promissoras dos complexos receptor-ligante de melhor perfil, foram analisadas pelo *software Discovery Studio Visualizer®* e dispostas em imagens, buscando identificar, nos ligantes estudados, interações semelhantes às encontradas nos fármacos de referência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE DOCKING POR REDOCKING

O *redocking* foi feito com o ligante co-cristalizado (E20) do alvo 4EY7. Dessa forma, o resultado do *redocking* pode ser visto conforme a Figura 13:

Figura 13 - Resultado de *redocking* do donepezil. Sobreposição do ligante co-cristalizado (branco) com o ligante após a redocagem (verde).



Fonte: Autoria própria (2022).

Como mostrado, nos cálculos de *redocking* o protocolo conseguiu recriar a conformação do ligante cristalográfico e obteve um RMSD de 0,41547. Isso pode ser visto na sobreposição mostrada na Figura 13, onde é possível perceber que a posição espacial do E20 redocado é muito semelhante ao ligante co-cristalizado com o alvo molecular.

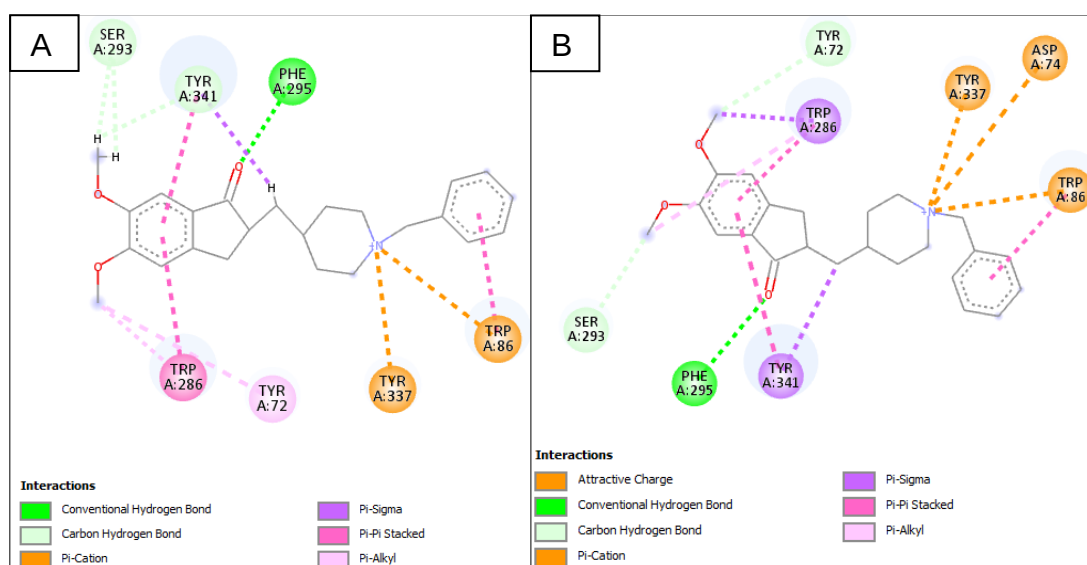
De forma geral, o protocolo de *docking* é considerado válido, por conseguir reproduzir de forma eficiente a conformação do ligante e obter um valor de RMSD próximo de zero.

5.2 DOCKING E INTERAÇÕES DOS FÁRMACOS CONHECIDOS

As interações do donepezil com os resíduos de aminoácidos podem ser vistos conforme a Figura 14. O resíduo TYR337 interage com nitrogênio do anel piperidínico do donepezil através de interações cátion- π .

Já o TRP286 apresenta interações do tipo empilhamento- π e π -alquil com o donepezil. Ambos os resíduos são importantes para a atividade da enzima. Apresenta também interação do tipo empilhamento- π e cátion- π com o TRP86, que faz parte do subsítio aniônico e ligação de hidrogênio com PHE295 que compõe o subsítio acila. É importante ressaltar que as interações aqui citadas se encontram tanto no ligante E20 cristalográfico, quanto no ligante redocado, somente a interação do ASP74 não foi vista no ligante redocado. O donepezil obteve um *fitness score* de 83.28, sendo o ligante de referência com a maior pontuação.

Figura 14 - Comparação das interações entre o donepezil redocado (A) e donepezil co-cristalizado (B).



Legenda: a – Donepezil redocado;

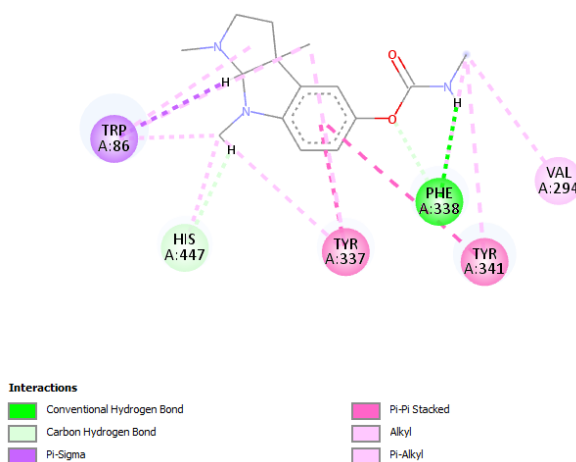
b – Donepezil co-cristalizado;

Fonte: Autoria própria (2022)

A fisostigmina (FIGURA 15) também apresenta interações importantes para o funcionamento como fármaco contra a AChE. De forma semelhante ao donepezil, apresentou interações com a TYR337, porém do tipo empilhamento- π e π -alquil. Além

disso, há interação com TRP86 do tipo π -sigma e π -alquil. Interações com o TYR341, que faz parte do subsítio aniônico periférico, através do tipo empilhamento- π e π -alquil. É observado uma interação fraca com HIS447, que compõe a tríade catalítica. Esse ligante obteve *GoldScore* de 60.25 e *ASP* 42.63.

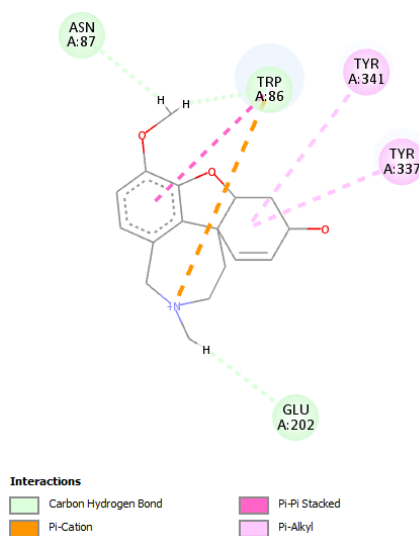
Figura 15 – Interações da fisostigmina com o alvo molecular 4EY7.



Fonte: Autoria própria (2022).

A galantamina (FIGURA 16) apresentou score de 66.31 e 44.15, respectivamente, as interações do tipo π -alquil com os resíduos TYR341 e TYR337, do PAS são evidenciadas. Também interação do tipo empilhamento π do anel benzenico do fármaco com o TRP86, além de interagir através de π -cátion com o mesmo resíduo.

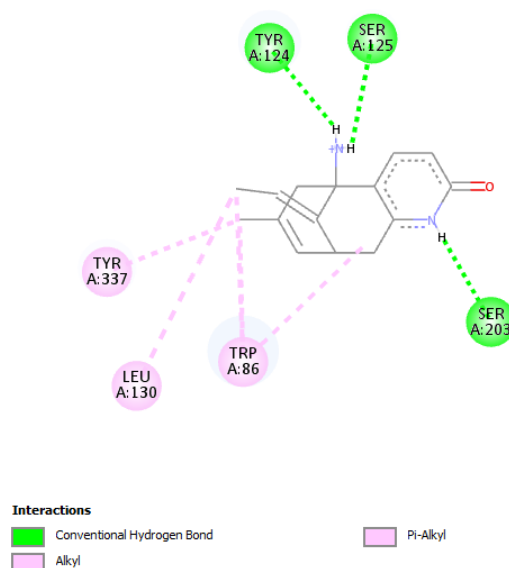
Figura 16 - Interações da galantamina com o alvo molecular 4EY7.



Fonte: Autoria própria (2022).

As interações predominantes na huperzina A (FIGURA 17), são de ligações de hidrogênio dos resíduos TYR124, SER125 e SER203 e interações do tipo π -alquil dos resíduos TYR337, LEU130 e TRP86. O resíduo de serina faz parte da tríade catalítica, já as interações com TYR337 e TRP86 são importantes para a inibição da enzima, no papel de reconhecimento de substratos. Os valores de *GoldScore* e *ASP* são de 58.95 e 31.47.

Figura 17 - Interações da huperzina A com o alvo molecular 4EY7.



Fonte: Autoria própria (2022).

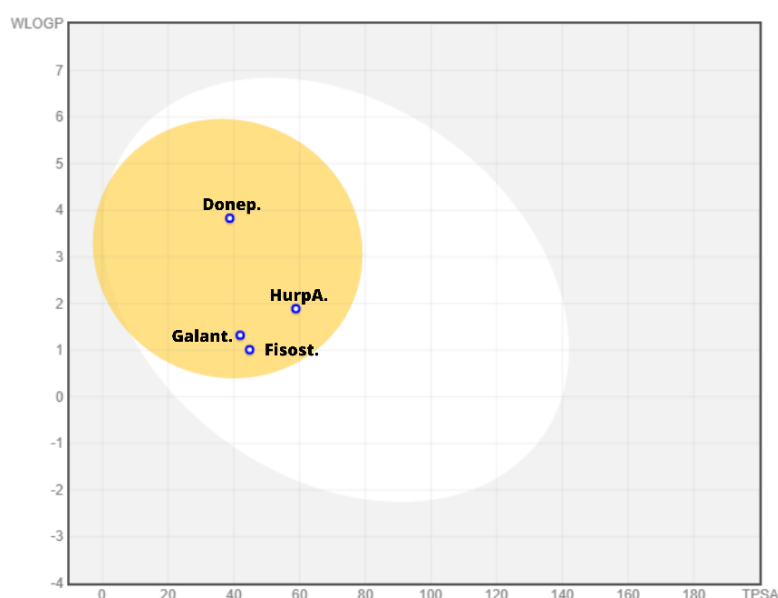
Todos os fármacos apresentam interações semelhantes e que contribuem para atividade dos fármacos, dessa forma, essas interações podem servir como referência na busca de novas moléculas que atuem como inibidores da AChE. Além disso, o *fitness score* de cada fármaco é outro fator que também pode ser levado em consideração. É importante perceber também que, os fármacos conseguem interagir com mais de um subsítio da AChE, dessa forma, a interação do ligante com mais de um subsítio contribui também para a inibição do alvo (VELOSSO et al., 2020).

5.2.1 Propriedades ADMET dos fármacos de referência

Os resultados de ADMET dos ligantes de referência podem ser vistos conforme o Gráfico 1 abaixo. O gráfico *BoiledEgg* (ovo cozido) obtido pelo SwissADME, se trata de uma forma intuitiva de analisar os parâmetros $LOG P_{o/w}$ que indica a lipofilicidade e TPSA (do inglês - *Topological Polar Surface Area*) para indicar a polaridade aparente (ERTL et al., 2000), e assim, é possível relacionar a absorção passiva no TGI e

permeabilidade na BHE. A região em branco (clara) é de alta probabilidade de absorção passiva pelo trato gastrointestinal, em amarelo (gema) se trata da região de alta possibilidade de permear passivamente a BHE. Ambas as regiões não são mutualmente exclusivas, podendo existir uma molécula nas duas regiões. Os pontos que representam as moléculas podem ser, azuis: moléculas que interagem com a glicoproteína-p (GP-p), ou vermelhas: não substrato da GP-p (DAINA et al., 2017).

Gráfico 1 - Parâmetros de absorção dos ligantes de referência apresentados no modelo BoiledEgg.



Fonte: SwissADME (2022).

Dessa forma, podemos perceber que os ligantes de referência se encontram em áreas ótimas de alta probabilidade de, tanto de serem absorvidos pelo TGI e de permear a BHE, o que condiz com a atividade dos fármacos, pois atuam no SNC, assim, mostrando condições ideais para atuarem como fármacos.

É possível perceber também que todos os fármacos são possíveis substratos da GP-p, indicando sofrer transporte ativo por essas barreiras e podendo afetar a sua distribuição, pois, segundo Barreiro et al., (2014) essa proteína auxilia no processo de detoxificação, transferindo para circulação sistêmica fármacos e seus metabólitos para posterior eliminação renal ou biliar. Essa proteína serve como uma barreira defensiva contra a entrada de xenobióticos no organismo, diminuindo a biodisponibilidade de medicamentos (SRIVALLI & LAKSHMI, 2012). Com relação ao metabolismo desses fármacos, preditos pelo SwissADME, o donepezil, a fisostigmina

e galantamina se demonstraram inibidores da CYP2D6 e inibidor da CYP3A4 especificamente para o donepezil. Seltzer (2005) e Farlow (2003), também relatam o papel dessas enzimas no metabolismo do donepezil e da galantamina. A huperzina A não demonstrou inibição em nenhuma das isoformas.

Com relação ao valores de *clearance* de cada fármaco, os resultados preditos pelo pkCSM, podem ser vistos conforme a tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Clearance dos fármacos de referência.

Fármaco	Clearance Total (log ml/min/kg)
Donepezil	1.008
Galantamina	0.991
Huperzina A	0.679
Fisostigmina	0.565

Fonte: Autoria própria (2022).

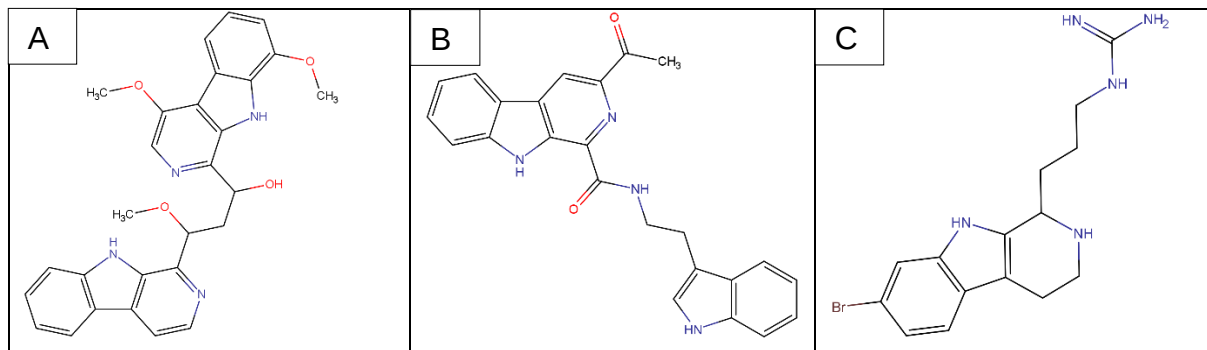
O donepezil e a galantamina obtiveram os maiores valores de *clearance* entre os fármacos, indicando sofrer uma eliminação mais eficiente desses fármacos pelo organismo e assim, o valor mais baixo do índice de *clearance* indica que maior a persistência das drogas no organismo (BARREIRO et al., 2014; PIRES et al., 2015; DAOUI et al., 2021).

De acordo com as predições de toxicidade realizadas pelo PreADME/Tox, nenhum dos fármacos demonstrou alto risco de inibição da hERG, somente médio risco para o donepezil, huperzina A e baixo risco para fisostigmina e galantamina. Além disso, somente a huperzina A se mostrou carcinogênico em ratos e camundongos.

5.3 DOCKING DOS ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS

De início, os melhores resultados de cada subclasse estão representados e os valores de *score* para cada um podem ser vistos, detalhadamente, na Tabela 3. Essa pontuação reflete na afinidade do ligante com a enzima, resultante das interações proteína-ligante. Quanto maior a pontuação *score* melhor é a interação entre o ligante e a enzima. Todos os alcaloides apresentaram pontuação acima dos fármacos usados como referência, em particular os ligantes B121, B81 e B132 (QUADRO 2) apresentaram pontuação maior que o donepezil, que por sua vez possui o maior *score* dentre eles.

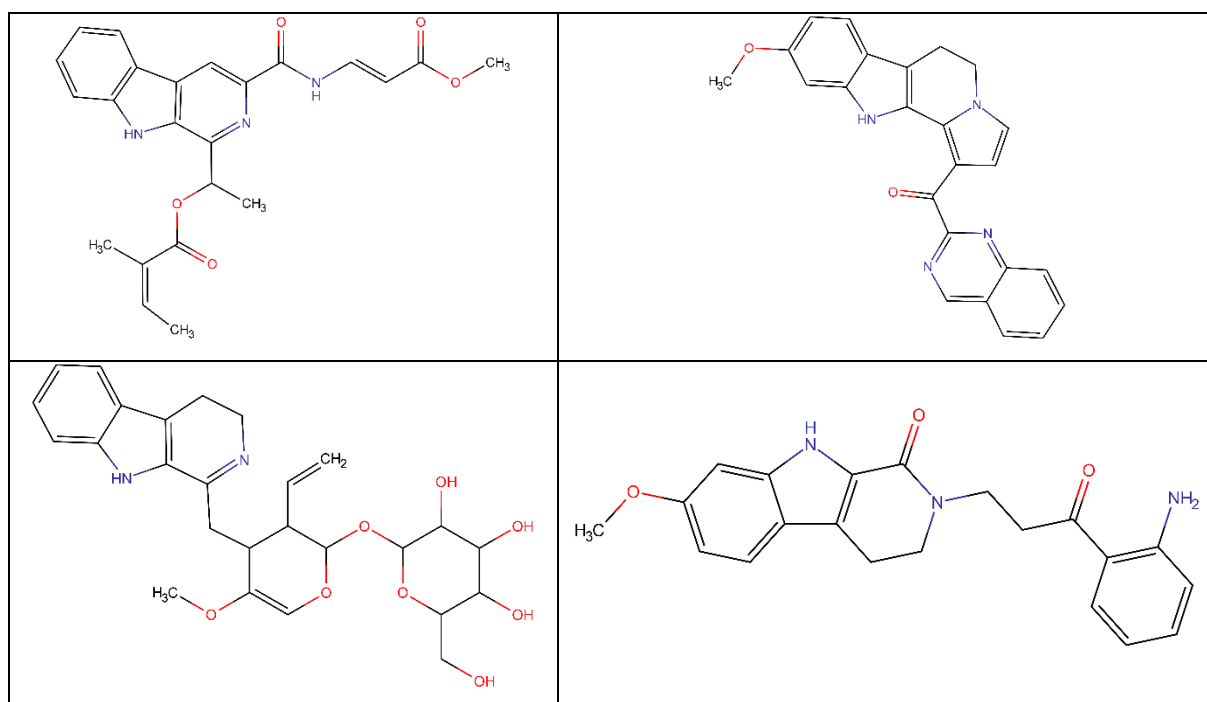
Quadro 2 - Estrutura dos alcaloides B121(A), B82(B) e B132(C), que obtiveram os maiores score entre os ligantes.



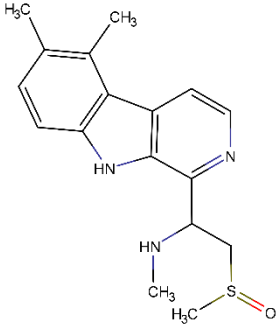
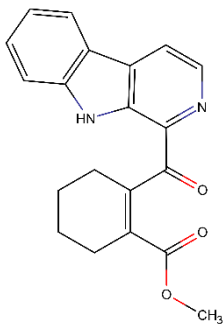
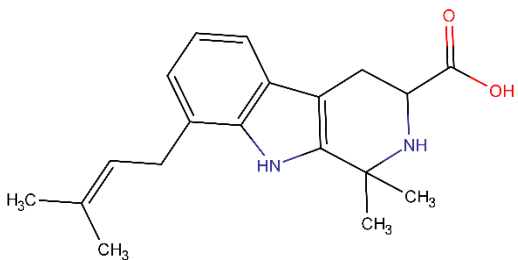
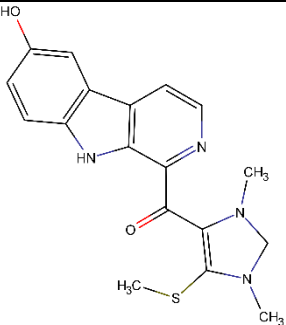
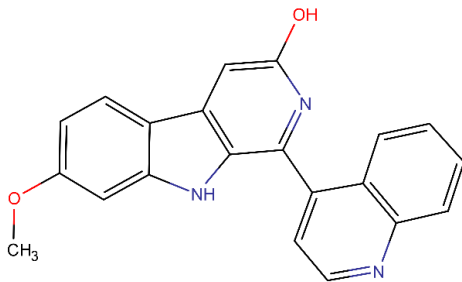
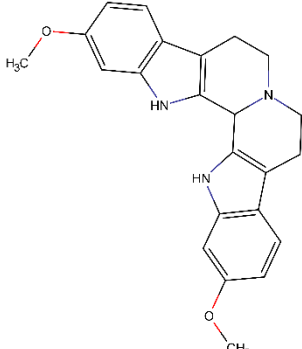
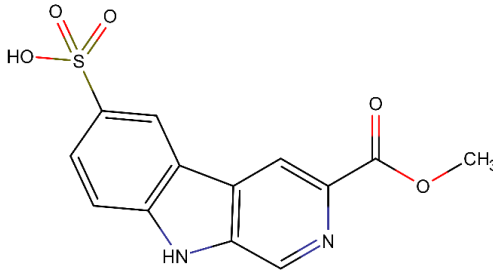
Fonte: Autoria própria (2022).

Os demais ligantes B48, B152, B125, B169, B11, B96, B138, B90, B82, B155, B27, respectivamente, (QUADRO 3) apresentaram pontuação acima somente dos fármacos galantamina, fisostigmina e huperzina A. É importante notar que a maior contribuição é o parâmetro $S(vdw_ext)$, que diz respeito à energia de *van der Waals* entre proteína-ligante, o que reflete numa maior contribuição por interações hidrofóbicas.

Quadro 3 – Demais alcaloides que obtiveram scores maiores que galantamina, fisostigmina e huperzina A.



Quadro 3 – Continuação.

Fonte: Autoria própria (2022).

Dessa forma, de acordo com a pontuação, todos os ligantes analisados possuem potencial de inibir a AChE, uma vez que possuem scores maiores que os fármacos já aprovados para o tratamento terapêutico da DA. Por esse motivo, todos os ligantes passaram pela avaliação das propriedades ADMET.

Tabela 3 - Valores de scores obtidos pelo programa GOLD usando a função *GoldScore*.

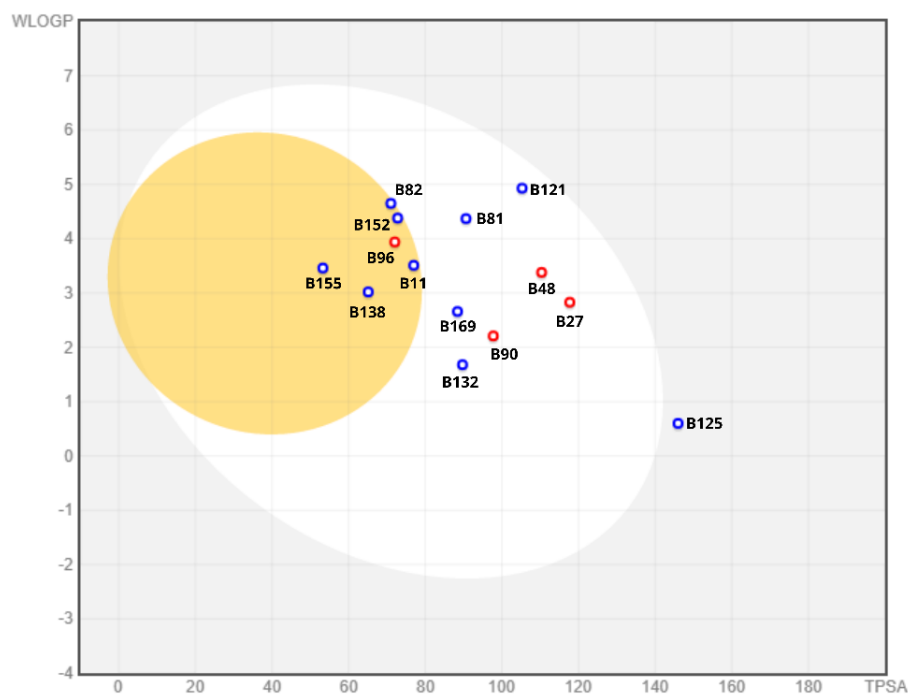
Ligante	GoldScore	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(int)	Nome	Subclasse
B121	98.19	4.91	69.43	-2.19	Quassidina H	Dímeros
B81	86.29	6.00	61.14	-3.78	Marinacarbolina D	Tricíclicos indol
B132	83.50	20.23	52.62	-8.65	(+)-7-bromotripargina	Tetrahydro básicos
Donepezil	83.28	0.80	61.01	-1.42	-	-
B48	82.61	0.07	61.83	-2.47	Dichotomida X	Tricíclicos acila amida
B152	81.52	1.58	61.66	-4.84	Pegaharmalina B	Tetrahydro cíclicos tetracíclicos
B125	80.67	3.25	57.57	-1.74	3,4-dihidro-strictosidina	Dihidro- β -carbolina
B169	79.07	0.00	58.92	-1.94	Trigonostemonina B	Divergentes
B11	76.85	11.44	50.70	-4.30	Eudistomidina J	Tricíclicos Básicos
B96	73.88	8.26	51.47	-5.15	Gelebolina C	Cíclicos e tetracíclicos
B138	72.43	4.91	51.35	-3.08	Penipalina B	Tetrahydro acila
B90	71.75	6.03	49.72	-2.64	Gesashidina A	Tricíclicos imidazol
B82	71.55	5.21	49.53	-1.76	Trigonostemina E	Tricíclicos quinolina
B155	71.36	0.00	51.99	-1.92	Trifilina A	Tetrahydro dímeros
B27	68.89	12.00	44.15	-3.83	Variabina A	Tricíclicos acila simples
Galantamina	66.31	11.62	39.05	-0.91	-	-
Fisostigmina	60.25	0.04	43.82	-0.05	-	-
Huperzina A	58.95	8.55	37.70	-1.44	-	-

Fonte: Autoria própria (2022).

5.3.1 Propriedades ADMET dos alcaloides β -carbolínicos

Os parâmetros de absorção dos alcaloides β -carbolínicos avaliados podem ser vistos conforme o Gráfico 2, abaixo:

Gráfico 2 - Parâmetros de absorção dos alcaloides β -carbolínicos apresentados no modelo *BoiledEgg*.



Fonte: Adaptado de SwissADME (2022).

Dessa forma, é possível avaliar que, dentro dos parâmetros de referência esperados, 8 alcaloides, variabina A (**B27**), dichotomida X (**B48**), marinacarbolina D (**B81**), gesashidina A (**B90**), quassidina H (**B121**), 3,4-dihidro-strictosidina (**B125**), (+)-7-bromotripargina (**B132**) e trigonostemonina B (**B169**), dos 14 avaliados estão fora dos parâmetros ideais de biodisponibilidade, em comparação aos ligantes de referência, ou seja, estão dentro da zona de absorção passiva pelo TGI, mas não conseguem permear a BHE. Dentre esses, a 3,4-dihidro-strictosidina (**B125**) está fora das duas zonas, por possuir um valor de TPSA muito elevado ($145.99\text{\AA}^2$), demonstrando alta polaridade. O valor ideal para esse parâmetro é entre $20\text{\AA}^2 < \text{TPSA} < 130\text{\AA}^2$ (DAINA et al., 2017).

Dentre eles, os três alcaloides quassidina H (**B121**), marinacarbolina D (**B81**) e (+)-7-bromotripargina (**B132**), que obtiveram maior pontuação *score*, como mostrada Tabela 3 do item 5.3, não obtiveram condições ótimas de biodisponibilidade.

As análises desses ligantes pelo SwissADME mostraram um valor de TPSA elevado, ficando ainda dentro da área ótima para ser absorvido pelo TGI, mas se distanciando da área de permeabilidade pela BHE, o que não condiz com as condições ideais esperadas em comparação aos parâmetros dos fármacos de referência.

Por outro lado, 6 dos 14 ligantes avaliados estão dentro dos parâmetros de referência esperados, com relação a absorção em ambos os sistemas (GRÁFICO 2). São eles: eudistomidina J (**B11**), trigonostemina E (**B82**), gelebolina C (**B96**), penipalina B (**B138**), pegaharmalina B (**B152**) e trifilina A (**B155**). Dentre eles, somente a gelebolina C (**B96**) não é substrato da GP-p. Todos os ligantes que se encontram em condições ótimas de absorção pelo TGI e de permear a BHE, obtiveram pontuação *score* maiores que os fármacos galantamina, fisostigmina e huperzina A, ficando atrás somente do donepezil conforme foi mostrado na tabela 2.

Com relação as interações com as enzimas CYP450, a eudistomidina J (**B11**), se mostrou inibidor da CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4. As moléculas trigonostemina E (**B82**) e gelebolina C (**B96**), demonstraram ser inibidores de 1A2, 2C19, 3A4 e 2D6, 2C9 especificamente para cada uma delas. Pegaharmalina B (**B152**) e trifilina A (**B155**) se mostraram inibidores de todas as CYP. Por outro lado, a penipalina B (**B138**) não demonstrou inibição de nenhuma isoformas da CYP. De acordo com Barreiro et al., (2014), a inibição dessas enzimas representa a diminuição da atividade catalítica, ou seja, de metabolizar esses fármacos, e como consequência disso, pode resultar no aparecimento de efeitos adversos ou tóxicos, decorrentes do aumento do tempo de meia vida, concentração e acúmulo do fármaco e de seus metabólitos no organismo.

Já para a inibição da hERG, somente a eudistomidina J (**B11**), demonstrou alto risco de inibição e os demais alcaloides avaliados apresentaram médio risco de inibição. Nenhum dos alcaloides apresentaram carcinogenicidade em ratos e camundongos, com exceção do alcaloide **B155**, que foi considerado carcinogênico para camundongos nos ensaios avaliados *in silico*. A Tabela 4 mostra um resumo dos alcaloides com os melhores perfis farmacocinéticos, em comparação aos parâmetros de referencias esperados.

Tabela 4 - Alcaloides com melhores perfis ADMET

	Log P _{o/w} ^a	TPSA	TGI/BHE	CYP ^b	Carcinogenicidade		hERG ^c
					Ratos	Camundongos	
B11	2.47	76.99Å ²	+	1A2, 2C19, 2D6, 3A4	-	-	Alto risco
B82	3.67	71.03Å ²	+	1A2, 2C19, 2D6, 3A4	-	-	Médio risco
B96	3.30	72.05Å ²	+	1A2, 2C19, 2C9, 3A4	-	-	Médio risco
B138	2.31	65.12Å ²	+	-	-	-	Médio risco
B152	3.49	72.80Å ²	+	1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4	-	-	Médio risco
B155	3.46	53.28Å ²	+	1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4	-	+	Médio risco

Legenda: a – Valor de consenso;

b – Inibidores de CYP;

c – Inibidores da hERG.

Fonte: Autoria própria (2022).

Com exceção do alcaloide penipalina B (**B138**), todos os outros alcaloides demonstraram inibição da maioria das isoformas da CYP450, o que pode prejudicar o organismo, pois retiram o poder dessas enzimas de metabolizar outros fármacos causando efeitos adversos e tóxicos (BARREIRO et al., 2014).

Os parâmetros de eliminação preditos de *clearance* total dos alcaloides em questão, podem ser vistos conforme a tabela 5:

Tabela 5 - Parâmetros de *clearance* total dos alcaloides β -carbolínicos.

Clearance Total (ml/min/kg)	
B11	1.013
B82	0.831
B96	0.807
B138	0.721
B152	0.957
B155	1.364

Fonte: Autoria própria (2022).

O *clearance* de um fármaco é importante porque pode afetar a maneira como o fármaco é usado e dosado. Essa propriedade é a quantidade de fármaco removida do corpo por unidade de tempo. Por exemplo, se o *clearance* de um fármaco for muito alto, pode ser necessário aumentar a frequência da dosagem para garantir que a concentração do fármaco no sangue se mantenha constante. Por outro lado, se o *clearance* for muito baixo, a dosagem pode precisar ser diminuída para evitar toxicidade (SHARGEL et al., 2012).

Portanto, de acordo com os dados, os valores preditos dos alcaloides apresentaram índice de *clearance* total maiores que todos os fármacos de referência. A trifilina A (**B155**), possui o maior valor de *clearance*. Isso indica que essa substância é eliminada mais rapidamente pelo organismo em comparação às outras substâncias listadas. eudistomidina J (**B11**), trigonostemina E (**B82**) e gelebolina C (**B96**), apresentam valores de *clearance* relativamente próximos, enquanto os alcaloides **B138** e **B152** possuem valores mais baixos.

Dessa forma, um valor mais alto do índice de *clearance* indica uma menor persistência das alcaloides no organismo e, portanto, podem sofrer uma eliminação mais eficiente, indicando que essas moléculas possuem uma estabilidade menor no organismo em comparação aos fármacos de referência (DAOUI et al., 2021).

No entanto, é importante lembrar que os valores de clearance podem variar amplamente entre indivíduos e que esses valores podem ser afetados por diversos fatores, como a função renal, a idade, o peso e a presença de doenças ou condições médicas (SHARGEL et al., 2012).

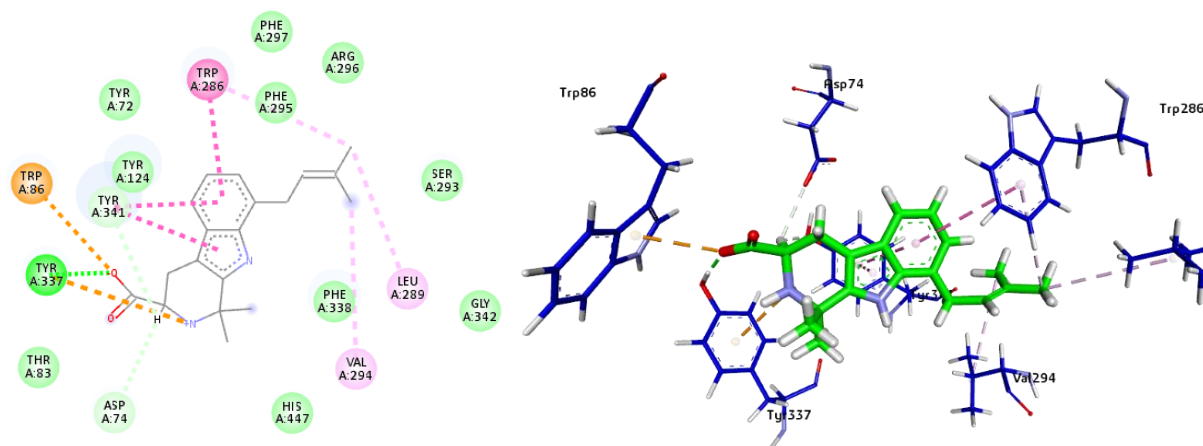
5.3.2 Interações dos melhores resultados dos alcaloides β -carbolínicos

De acordo com os resultados de *docking* e do perfil ADMET, o alcaloide penipalina B (**B138**) se mostrou como o mais promissor alcaloide β -carbolínico frente à AChE (FIGURA 18), por apresentar um score maior que fármacos já aprovados para o tratamento terapêutico da DA, com características favoráveis para atuação como fármaco.

Esse alcaloide interage através de algumas interações importantes para atuar como inibidor da AChE. O TYR337 interage com o ligante através de ligação de hidrogênio com grupo carboxilato do ligante, atuando como acceptor de hidrogênio desse resíduo.

Além disso, o TYR337 também interage com o grupo amino quaternário carregado positivamente por interação π -cátion. Esse resíduo faz parte do subsítio PAS, Almeida (2014) cita que o papel desse subsítio é guiar e orientar a parte positiva do substrato para o sítio ativo da AChE. Para reafirmar esse papel, Cheung et al., (2012) relata que a interação com o resíduo TYR337 tem sido reportado como uma porta oscilante na entrada de substratos ao sítio ativo, sendo uma importante interação para a inibição da AChE (QUADRO 4).

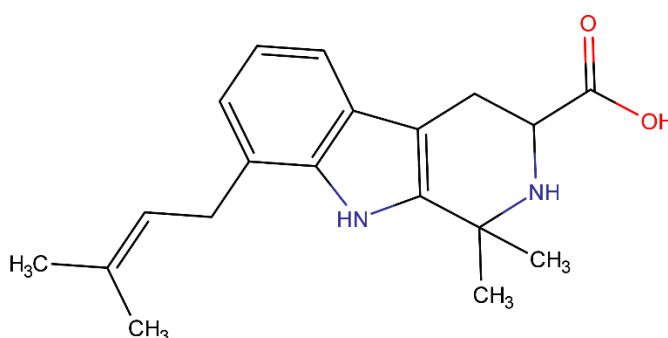
Quadro 4 - Interações do alcaloide B138 (PENIPALINA B) com a AChE.



Fonte: Autoria própria (2022).

Outras interações importantes se fazem com o TRP86 do subsítio aniônico, TYR341 e TRP286 do PAS, através de π -ânion e empilhamento π , respectivamente. Esses resíduos contribuem para o potencial de inibição de ligantes, especialmente para o TRP86, pois em inibidores potentes como o donepezil, essa interação acontece por π -cátion entre grupos protonados (ALMEIDA, 2014), como também pode ser visto com a galantamina. Porém, não foi possível obter esse modo de interação com o alcaloide B138, uma vez que essa interação com o TRP86 se apresenta por meio de π -ânion com o oxigênio desprotonado do grupo carboxilato do ligante.

Figura 18 - Estrutura do alcaloide B138 (Penipalina B).



Fonte: Autoria própria (2022).

A penipalina B é descrito por Santos (2016), como um alcaloide β -carbolínico da subclasse tetrahydro acila, isolado a partir do fungo *Penicillium paneum*, onde Li et al., (2014) primeiramente isolou e relatou a sua atividade citotóxica frente à dois tipos de células tumorais.

Portanto, diante do que foi exposto, esse alcaloide se mostrou como o ligante com o maior potencial de inibir a AChE. De modo geral, esse alcaloide apresenta interações que também são observadas nos fármacos de referência, se ligando com mais de um subsítio, podendo indicar que esse ligante pode atuar na inibição da AChE. Essas interações são encontradas com maior similaridade nos fármacos donepezil, galantamina e fisostigmina. Além disso, apresentou o perfil farmacocinético favorável para a sua atuação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O desenvolvimento de novas moléculas capazes de inibir a AChE ainda é alvo de muitos estudos para o tratamento terapêutico da doença de Alzheimer, levando em conta a hipótese colinérgica, como uma forma de desacelerar a progressão da doença.
- ✓ Nesse estudo, 92 alcalóides β -carbolínicos foram selecionados e avaliados frente a AChE a partir de estudos totalmente *in silico*.
- ✓ Os estudos por *docking* molecular evidenciaram 14 alcalóides promissores com potencial inibição frente à AChE.
- ✓ Porém, a avaliação ADMET mostrou que somente um desses ligantes seria um fármaco ideal, de acordo com parâmetros de fármacos já conhecidos por atuarem no tratamento da DA.
- ✓ A penipalina B, foi o alcaloide que demonstrou características físico-químicas e farmacocinéticas desejáveis para a atuação de um fármaco no SNC, com grande potencial de permear a BHE, absorção pelo TGI, baixa toxicidade e não atuou como inibidor de nenhuma CYP450.
- ✓ Por fim, foi demonstrado que a penipalina B, obteve pontuação *score* maior que os fármacos de referência e interagiu com resíduos importantes para a inibição da AChE.
- ✓ É importante ressaltar que ainda são necessários estudos mais robustos e com maior precisão, além de testes pré-clínicos e clínicos, para a validação dessa molécula para o tratamento terapêutico da Doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Buana Carvalho de. **Metabólitos secundários como potenciais inibidores de CDK8 (proteína quinase humana)**. 2018. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018. doi:10.11606/T.75.2018.tde-25042018-142801. Acesso em: 11 jun. 2022.
- ALMEIDA, J.R. **Planejamento, ensaio e otimização in silico de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase**. 2014. 156f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- ALMEIDA, J.R. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**. 2014. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION, **Alzheimer's Disease Facts and figures. Alzheimer's & Dementia**. Disponível em: <https://www.alz.org/>. Acesso: 24 jun. 2022
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, **Dementia Facts & figures**. Disponível em: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/>. Acesso: 04 maio 2022
- ARBOR, S. C.; LAFONTAINE, M.; CUMBAY, M. Amyloid-beta Alzheimer targets — protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. **YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE**. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797837/>. Acesso: 04 maio 2022.
- BALLANTE, F.; MARSHALL, G.R. An Automated Strategy for Binding-pose Selection and Docking Assessment in Structure-Based Drug Design. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v56, p.54-72, 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.5b00603>. Acesso: 11 jun. 2022.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2014.
- BARROS, M. E. S. B. **Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4**. 2015. Tese (Doutorado em Química) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Recife, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/18477>. Acesso em: 28 jun. 2022.
- BRAGA, R. C.; ALVES, V. M.; SILVA, M. F. B.; *et al.* Pred-hERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity. **Molecular Informatics**, v. 34, n. 10, p. 698–701, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/minf.201500040>. Acesso em: 5 nov. 2022.

CAPRINO, L; RUSSO, P. Developing a paradigm of drug innovation: an evaluation algorithm. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 21–22, p. 999–1006, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644606003709>>. Acesso em: 15 out. 2022.

CALLAWAY, E. Gene mutation defends against Alzheimer's disease. **Nature**, v. 487, n. 7406, p. 153–153, 1 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/487153a>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

CASTILHO, L. N. P. **Docking molecular aplicado ao estudo da formação de complexos entre análogos de resveratrol e derivados de 1,2,3-triazol e a enzima cox-2**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - UFSCar, São Carlos, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6996>. Acesso em: 15 jun. 2022.

CCDC. **Pose prediction with GOLD**. Cambridge Crystallographic Data Centre, 2020. Disponível em: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/ccdcresources/>. Acesso em: 15 jun. 2022.

COELHO, H. M. N. **Avaliação in vitro de inibidores peptídicos da β -secretase 1 para o tratamento da Doença de Alzheimer**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10362/19570>. Acesso: 5 abr. 2022

COIMBRA, J. R. M. **Alvos terapêuticos na Doença de Alzheimer: relevância da BACE 1 e o desenvolvimento de inibidores desta secretase**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas.) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/48480>. Acesso em: 10 maio 2022.

COSTA, Daniel Castro da; FERREIRA, Jaderson Vieira; CORREA, Lenir Cabral; et al. Compostos bioativos e seus alvos terapêuticos com propriedade Anti-Alzheimer: Uma revisão da literatura. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v. 2, n. 2, p. 133–156, 2019. Disponível em: <<http://arqcientificosimmes.emnuvens.com.br/abi/article/view/229/91>>. Acesso em: 15 mar. 2022.

CHEUNG, J. et al. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282–10286, 26 nov. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23035744/>. Acesso: 16 jun. 2022.

DAINA, A; MICHIELIN, O; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep42717>>. Acesso em: 15 out. 2022.

DAOUI, Ossama; ELKHATTABI, Souad; CHTITA, Samir; et al. QSAR, molecular docking and ADMET properties in silico studies of novel 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[D]-thiazol-2-Yl derivatives derived from dimedone as potent anti-tumor agents through inhibition of C-Met receptor tyrosine kinase. **Heliyon**, v. 7, n. 7, p. e07463, 2021.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844021015668>>. Acesso em: 31 dez. 2022.

DE GROOT, M. J. Designing better drugs: predicting cytochrome P450 metabolism. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 13–14, p. 601–606, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644606001607>>. Acesso em: 15 out. 2022.

DE LUCA, Vincenzo; ST PIERRE, Benoit. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 4, p. 168–173, 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138500015752>>. Acesso em: 1 fev. 2023.

DEL CISTIA, C. D. N. **Modelagem molecular aplicada ao estudo de reações de inibição enzimática com aplicação potencial no controle de Leishmania amazonensis**. 2010. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2010. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/2713>. Acesso em: 10 jun. 2022.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2009.

DIAS, C. RAUTER, A. Carbohydrates and glycomimetics in Alzheimer's Disease therapeutics and diagnosis. **RSC Drug Discovery Series**. 2015.

DIMASI, J. A; HANSEN, R. W; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151–185, 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167629602001261>>. Acesso em: 15 out. 2022.

DockThor: a receptor-ligand docking program. Grupo de Modelagem Molecular de Sistemas Biológicos - GMMSB, 2022. Disponível em: <https://www.dockthor.lncc.br/v2/>. Acesso: 26 jun. 2022

DVIR, H; SILMAN, I; HAREL, M; et al. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 10–22, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279710000669>>. Acesso em: 20 set. 2022.

ERTL, P; ROHDE, B; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714–3717, 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm000942e>>. Acesso em: 5 nov. 2022.

FALCO, Anna De; CUKIERMAN, Daphne Schneider; HAUSER-DAVIS, Rachel A.; et al. ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. **Química Nova**, 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150152>>. Acesso em: 10 out. 2022.

FARLOW, Martin R. Clinical Pharmacokinetics of Galantamine: **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 15, p. 1383–1392, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2165/00003088-200342150-00005>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

FERREIRA-VIEIRA, Talita; M. GUIMARAES, Isabella; R. SILVA, Flavia; *et al.* Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 1, p. 101–115, 2016. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-159X&volume=14&issue=1&spage=101>>. Acesso em: 03 jun. 2023.

GELDENHUYS, W. J.; GAASCH, K. E.; WATSON, M.; ALLEN, D. D. *et al.* Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 11, n. 3-4, p. 127-32, 2006.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2017.

GOSH, A.K.; OSSWALD, H.L. BACE1 (β -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's Disease. **Chem. Soc. Rev.**, 2014. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/cs/c3cs60460h>. Acesso: 04 maio 2022.

INMAN, Wayne D.; BRAY, Walter M.; GASSNER, Nadine C.; *et al.* A β -Carboline Alkaloid from the Papua New Guinea Marine Sponge *Hyrtios reticulatus*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 2, p. 255–257, 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np9005426>>. Acesso em: 1 fev. 2023.

JIMÉNEZ, Judith; RIVERÓN-NEGRETTE, Leticia; ABDULLAEV, Fikrat; *et al.* Cytotoxicity of the β -carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, n. 4–5, p. 381–389, 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094029930800050X>>. Acesso em: 1 fev. 2023.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A.R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v.267, n.3, p727-748, abr. 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283696908979>. Acesso: 04 maio 2022.

JUCKER, M.; WALKER, L. C. Pathogenic protein seeding in alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 4, p. 532–540, out. 2011.

KIAMETIS, A. S. *et al.* Potential acetylcholinesterase inhibitors: molecular docking, molecular dynamics, and in silico prediction. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, n. 2, p. 67, fev. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28185116/>. Acesso: 04 maio 2022.

KONRATH, E. L. et al. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1701–1725, 18 nov. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24236981/>. Acesso: 28 jun. 2022

LAINE, Aino; LOOD, Christopher; KOSKINEN, Ari. Pharmacological Importance of Optically Active Tetrahydro- β -carbolines and Synthetic Approaches to Create the C1 Stereocenter. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1544–1567, 2014. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/2/1544>>. Acesso em: 1 fev. 2023.

LI, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 7, p. 357–366, 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644601017123>>. Acesso em: 15 out. 2022.

LI, C.S; LI, X.M; AN, C.Y; et al. Prenylated Indole Alkaloid Derivatives from Marine Sediment-Derived Fungus *Penicillium paneum* SD-44. **Helvetica Chimica Acta**, v. 97, n. 10, p. 1440–1444, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hlca.201400035>>. Acesso em: 12 nov. 2022.

LI, Shu-Ping; WANG, Yu-Wen; QI, Sheng-Lan; et al. Analogous β -Carboline Alkaloids Harmaline and Harmine Ameliorate Scopolamine-Induced Cognition Dysfunction by Attenuating Acetylcholinesterase Activity, Oxidative Stress, and Inflammation in Mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 346, 2018. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00346/full>>. Acesso em: 2 jan. 2023.

LIEW, Lydia P.P.; FLEMING, Jessica M.; LONGEON, Arlette; et al. Synthesis of 1-indolyl substituted β -carboline natural products and discovery of antimalarial and cytotoxic activities. **Tetrahedron**, v. 70, n. 33, p. 4910–4920, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402014007625>>. Acesso em: 1 fev. 2023.

LIMA, B. R. D. **PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (AChE) EM ESPÉCIES DO GÊNERO ONYCHOPETALUM (ANNONACEAE) PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**. 2019. Tese (Doutorado em Química) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, Manaus, 2019. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/7860>. Acesso em: 28 jun. 2022.

LIMA, M. V. S. **Complexos de metais de transição: aplicações no tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer**. 2014. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/10720>. Acesso: 14 jun. 2022.

MAIA, E. H. B. et al. Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 343, 28 abr. 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00343/full>. Acesso: 28 jun. 2022.

MARTINS, Simoni Bergmann. **Transportadores de Membrana e sua Influência nos Processos de Absorção e Disposição de Fármacos**. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/117106>. Acesso em: 30 dez. 2022.

MEEK, P. J.; LIU, Z.; TIAN, L.; WANG, C. Y. ET AL. Shape Signatures: speeding up computer aided drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 11, n. 19-20, p. 895- 904, 2006.

MODA, T. L. **Desenvolvimento de modelos *in silico* de propriedades de ADME para a triagem de novos candidatos a fármacos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. doi:10.11606/D.76.2007.tde-22032007-112055. Acesso em: 15 de out. 2022.

MORENO, Paulo R.H.; POULSEN, Charlotte; VAN DER HEIJDEN, Robert; *et al.* Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 2, p. 99–107, 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014102299500078X>>. Acesso em: 1 fev. 2023.

NIES, Anne T.; KOEPESELL, Hermann; DAMME, Katja; *et al.* Organic Cation Transporters (OCTs, MATes), In Vitro and In Vivo Evidence for the Importance in Drug Therapy. *In*: FROMM, Martin F.; KIM, Richard B. (Orgs.). **Drug Transporters**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, v. 201, p. 105–167. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-14541-4_3>. Acesso em: 30 dez. 2022.

NG, Yu Pong; OR, Terry Cho Tsun; IP, Nancy Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 260–270, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018615300206>>. Acesso em: 2 jan. 2023.

ORHAN, I. E. Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2252–2261, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22414107/>. Acesso: 28 jun. 2022.

PARK, S.Y., 2010. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. **Arch. Pharm. Res.** 33, 1589-1609. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21052936/>. Acesso: 28 jun. 2022.

PEREIRA, R. A.G. **Síntese de um potencial inibidor da β -secretase e sua interação com a enzima**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR, Covilhã, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.6/2868>. Acesso: 10 maio 2022

PEREIRA, D. M.; FERRERES, F.; OLIVEIRA, J. M.; GASPAR, L.; FRIA, J.; VALENTÃO, P.; SOTTOMAYOR, M.; ANDRADE, P. B. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic

neurotransmission. **Phytomedicine**, v. 17, p. 646–652, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19962870/>. Acesso: 28 jun. 2022.

PIRES, Douglas E. V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>. Acesso em: 29 dez. 2022.

QUINTANOVA, C. I. R. **NOVOS COMPOSTOS HÍBRIDOS COM POTENCIAL AÇÃO NEUROPROTETORA**. 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10451/9669>. Acesso em: 16 jun. 2022.

ROCHA, J. A. **Planejamento racional, síntese, caracterização e estudo in silico de complexos metálicos de rutênio e alcaloides de *Pilocarpus microphyllus* contra a esquistossomose**. 2018. 194p. Tese - Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí. Acesso em: 31 out. 22

ROSADO, J. O. **Análise de redes de interações entre drogas quimioterápicas usadas no tratamento de câncer gástrico: explorando proteínas e processos biológicos por meio de ferramentas de farmacologia de sistemas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/61436>. Acesso em: 10 jun. 2022.

SANTOS, S. P. D. **Alcaloides indólicos de *Aspidosperma pyrifolium*: Estudo químico e dados espectroscópicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/22561>. Acesso: 15 Jun 2022.

SEIDL, C. **EFEITOS DA ULEÍNA EM ALVOS RELACIONADOS COM A DOENÇA DE ALZHEIMER E ESTUDOS ENZIMÁTICOS ON-LINE COM A ENZIMA BETA-SECRETASE IMOBILIZADA**. 2014. Dissertação (Doutorado em Química) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Curitiba, 2014. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/35876>. Acesso em: 24 jun. 2022.

SELTZER, Ben. Donepezil: a review. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 1, n. 3, p. 527–536, 2005. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.1.3.527>. Acesso em: 29 dez. 2022.

SILVA, A. S. A. **A BACE1 como alvo terapêutico na Doença de Alzheimer**. 2016. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016. Disponível em: <https://eg.uc.pt/handle/10316/40809>.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, 2007.

SINHA, M; DHAWAN, A; PARTHASARATHI, R. In *Silico Approaches in Predictive Genetic Toxicology. Genotoxicity Assessment*. Springer New York, 2019, v. 2031, p. 351–373. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9646-9_20. Acesso em: 5 nov. 2022.

SOUZA, S. P.; VALVERDE, S. S.; SILVA, R. L.N.R.; LIMA, K. S.C.; LIMA, A. L.S.; Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase. **Revista Fitos**. Jacarepaguá, v.7 n.04, 2013. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/161>. Acesso: 10 maio 2022.

SOUZA, R. L. **APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ANCORAGEM MOLECULAR NA OTIMIZAÇÃO DO FÁRMACO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Farmacêuticas) - Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas, 2015. Disponível em: <https://ulbra-to.br/bibliotecadigital/publico/home/documento/169>. Acesso em: 28 jun. 2022.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C. ET AL. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 872-9, 1991.

SHARMA, K.N. et al. Exploring the ameliorative role of $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulation in epilepsy and associated comorbidities in post-PTZ-kindle mice. **Epilepsy Behav.** 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31917144/>. Acesso: 04 maio 2022.

SHARGEL, Leon; YU, Andrew B. C.; WU-PONG, Susanna. **Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics**. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2012.

SRIVALLI, K. M. R; LAKSHMI, P. K. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 353–367, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502012000300002&lng=en&tling=en . Acesso em: 5 nov. 2022.

SQUIRE, L. R.; BLOOM, F. E.; SPIZER, N. C.; LAC, S.; GHOSH, A.; BERG, D. **Fundamental Neuroscience**: 3º Ed. Canada: Elsevier, 2008. ISBN: 978-0-12-374019-9.

TAVARES, L. C. Planejamento e desenvolvimento de novos fármacos: os primeiros passos do Brasil. **Pharmacia Brasileira**, 2009.

TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v.1, n.2. 2001.

TORRES, K.C.L.; SANTOS, R.R.; MAPA, F.C.; MORAES, F.L.; MORAES, E.N; SILVA, M.A.R; Biomarkers in Alzheimer disease. **Geriatr Gerontol Aging**. 2012. Disponível em: <http://ggaging.com/details/191/pt-BR/biomarkers-in-alzheimer-disease> Acesso: 20 maio 2022.

TUMIATTI, V.; MINARINI, A.; BOLOGNESI, M. L.; MILELLI, A. ET AL. Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. **Curr. Med Chem**, v. 17, n. 17, p. 1825-38, 2010.

VANDENBERG, J. I.; PERRY, M. D.; PERRIN, M. J.; et al. hERG K⁺ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3, p. 1393–1478, 2012. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00036.2011>>. Acesso em: 5 nov. 2022.

VAN DE WATERBEEEMD, H; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192–204, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd1032>>. Acesso em: 15 out. 2022

VELLOSO, M. H. R. et al. Estudos de docking molecular da interação de bis-purinas com acetilcolinesterase para o tratamento da Doença de Alzheimer. **Health and Biosciences**, Espírito Santo, v. 01, n. 02, p. 101-118, 12 ago. 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufes.br/healthandbiosciences/article/view/31794>. Acesso em: 25 set. 2022.

VIDEIRA, R. M. A. S. **Pesquisa de inibidores enzimáticos em óleos essenciais. Estudo da actividade em BACE-1, uma protease aspártica envolvida na doença de Alzheimer**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas,) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/28917>. Acesso em: 10 maio 2022.

VILELA, A. F. L. **Co-imobilização das enzimas acetilcolinesterase e β -secretase1**: estudo de condições para triagem de ligantes. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-06072018-110632/>. Acesso em: 24 jun. 2022.

ZHAO, Ting; DING, Ke-min; ZHANG, Lei; et al. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities of β -Carboline and Quinoline Alkaloids Derivatives from the Plants of Genus *Peganum*. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–6, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/717232/>>. Acesso em: 2 jan. 2023.