



Universidade de Brasília

Instituto de Química - IQD

NÍCOLAS RICARDO DE MELO ALVES

**DESENHO DE NOVOS HETERODÍMEROS COMO
PROPOSTA À INIBIDORES DA ACHE HUMANA**

BRASÍLIA

2023

NÍCOLAS RICARDO DE MELO ALVES

**DESENHO DE NOVOS HETERODÍMEROS COMO
PROPOSTA À INIBIDORES DA ACHE HUMANA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) em
Bacharelado em Química apresentado ao
Instituto de Química da Universidade de Brasília

Orientador: João Batista Lopes Martins

BRASÍLIA

2023

“As coisas têm vida própria. Tudo é uma questão de despertar suas almas”

Cem Anos de Solidão, Gabriel García Márquez

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa associada a mais de 70% dos casos de demência na população idosa. A principal via de tratamento para a DA leva em conta a hipótese colinérgica que correlaciona a neurodegeneração com o déficit dos receptores colinérgicos, como a acetilcolina (ACh). Assim, o tratamento do Alzheimer baseia-se na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) visando a restauração do equilíbrio colinérgico. A inibição da AChE ocorre diretamente no seu sítio ativo, chamado Gorge, com uma entrada estreita e repleta de resíduos aromáticos com um alargamento na base do sítio, onde se encontra a tríade catalítica.

Neste trabalho, utilizando técnicas de bioisosterismo e heterodimerização, 30 novos ligantes com potencial de inibidores da AChE foram desenhadas e tiveram sua capacidade inibitória para uso no tratamento da doença de Alzheimer. As novas estruturas tiveram suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade avaliadas, o que permitiu concluir que apenas 10 eram viáveis de seguirem em estudo. Através de cálculos de docking molecular, observou-se que os ligantes que continham apenas 3 carbonos no grupo espaçador exibiam os melhores resultados de docking, permitindo escolher as 5 estruturas finais deste trabalho.

Em seguida, estes ligantes tiveram sua estrutura otimizada através de cálculos de estrutura eletrônica utilizando o método DFT. Com a estrutura otimizada, observou-se que os ligantes interagem principalmente com os resíduos Tyr124, Trp236, Tyr337, Phe338 e Tyr341. Estes cálculos também forneceram informações sobre os orbitais moleculares de fronteira e os sítios de reatividade das entidades, que em sua maioria, se distribuíram em torno dos elétrons pi deslocalizados dos anéis aromáticos e em torno dos átomos eletronegativos presentes no grupo espaçador.

Mediante os resultados obtidos foi possível classificar os ligantes como potenciais inibidores e avaliar o desempenho individual de cada um. Aquelas que obtiveram os melhores resultados foram as entidades que continham no seu grupo espaçador 3 carbonos e as funções orgânicas: alceno, amida e cetona.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease associated with more than 70% of cases of dementia in the elderly population. The main treatment for AD considers the cholinergic hypothesis that correlates neurodegeneration with a deficit in cholinergic receptors, such as acetylcholine (ACh). Thus, Alzheimer's treatment is based on the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) aiming to restore cholinergic balance. AChE inhibition occurs directly at its active site, called Gorge, with a narrow entrance full of aromatic residues with a widening at the base of the site, where the catalytic triad is located.

In this work, using bioisosterism and heterodimerization techniques, 30 new ligands with AChE inhibitor potential were designed and had their inhibitory capacity for use in the treatment of Alzheimer's disease. The new structures had their absorption, distribution, metabolism, elimination and toxicity properties evaluated, which led to the conclusion that only 10 were viable for further study. Through molecular docking calculations, it was observed that ligands that contained only 3 carbons in the linking group exhibited the best docking results, allowing us to choose the 5 final structures of this work.

Then, these ligands had their geometries optimized through using the DFT calculations. With the optimized structure, it was observed that the ligands interacted mainly with residues Tyr124, Trp236, Tyr337, Phe338 and Tyr341. These calculations also provided information about the frontier molecular orbitals and reactivity sites of these entities, which were mostly distributed around the pi electrons from the aromatic rings and around the electronegative atoms present in the linking group.

Based on the results obtained, it was possible to classify the ligands as potential inhibitors and evaluate the individual performance of each one. Those that obtained the best results were the entities that contained 3 carbons in their spacer group and the organic functions: alkane, amide and ketone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos macroscópicos da atrofia cerebral em pacientes com Alzheimer	11
Figura 2 - Mecanismo de ação hidrolítica da AChE, adaptado	14
Figura 3 - Representação 3D em fita do monômero globular da AChE humana	15
Figura 4 - Sítio ativo da acetilcolinesterase humana (hAChE)	16
Figura 5 - Representação gráfica do sítio (Gorge) ativo da AChE humana, adaptado	17
Figura 6 - Estrutura molecular 2D da donepezila	18
Figura 7 - Estrutura molecular 2D da galantamina	19
Figura 8 - Estrutura molecular 2D da rivastigamina	19
Figura 9 - Estrutura molecular 2D do ladostigil	20
Figura 10 - Estrutura molecular 2D geral das huprinas	21
Figura 11 - Estrutura molecular 2D da huprina W	21
Figura 12 - Esquema da heterodimerização usada no desenho das 30 moléculas propostas.....	29
Figura 13 - Gráfico BOILED-Egg de todas as 30 moléculas propostas.....	35
Figura 14 - Gráfico em barras dos resultados obtidos das 10 moléculas que seguiram em estudo.....	36
Figura 15 - Estrutura química final dos híbridos propostos para estudo.....	37
Figura 16 - Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDAC.....	37
Figura 17 - Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDAD.....	38
Figura 18 - Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDCT.....	39
Figura 19 - Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDES.....	40
Figura 20 - Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDET.....	40
Figura 21 - Representação das regiões de interações não-covalentes (NCI).....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado do estudo ADMET de 15 dos ligantes propostos.	31
Tabela 2. Resultado do estudo ADMET de 15 dos ligantes propostos.	32
Tabela 3. Resultado do estudo ADMET de 15 dos ligantes propostos.	33
Tabela 4. Resultado do estudo ADMET de 15 dos ligantes propostos.	34
Tabela 5. Valores do gap de energia e carga dos hidrogênios mais ácidos para cálculo de estrutura eletrônica usando DFT.	41
Tabela 6. Representação gráfica dos orbitais moleculares ocupados e seus respectivos valores usando o método DFT.	43
Tabela 7. Representação gráfica dos orbitais moleculares desocupados e seus respectivos valores usando o método DFT.	44
Tabela 8. Índices de reatividade de Fukui dos ligantes propostos.	46
Tabela 9. Representação das regiões indicadas pelas funções de Fukui.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA	Doença de Alzheimer
ACh	Acetilcolina
ChAT	Colina Acetiltransferase
AChE	Acetilcolinesterase
<i>TcAChE</i>	<i>Torpedo californica</i> acetilcolinesterase
<i>hAChE</i>	Acetilcolinesterase humana
PAS	Sítio periférico aniônico
CAS	Sítio catalítico
FDA	U.S's Food and Drug Administration
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BuChE	Butirilcolinesterase
MAO	Monoamina oxidase
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade
DFT	Teoria do funcional de densidade
NCI	Interações não-covalentes
PDB	Protein Data Bank
SMD	Solvent Model Density
BOILED	Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method
HDAC	Heterodímero alcano
HDAD	Heterodímero amida
HDCT	Heterodímero cetona
HDES	Heterodímero éster
HDET	Heterodímero éter

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço inteiramente aos meus pais, Mara e Antônio, por me darem a vida, o suporte, o valor aos estudos e todo o amor do mundo necessário para eu me tornar quem sou.

A minha irmã Marina e ao meu cunhado Bruno, por serem o meu maior porto seguro e por me acolherem sempre com todo o carinho do mundo.

Ao meu irmão Igor, que segue sendo minha maior referência de cientista.

A minha madrinha Dayse, por ter um olhar afetuoso para cada passo que dou.

Ao meu gato Pretinho, por todo amor e carinho desde que o conheci.

Agradeço a minha segunda família, meus amigos de toda a vida, Ana Beatriz, Ana Luiza, Gustavo, Júlia e Leonardo. A minha jornada não seria a mesma sem a companhia diária de vocês.

A minha amiga Ana Luiza por ter sido uma enorme companheira e parceira durante todos esses anos de faculdade. Aos meus amigos Amanda e Marco, por me mostrarem que ainda havia pessoas legais no IQ.

A prof.^a Dra. Érica Cristina, por toda a paciência, carinho, atenção e disponibilidade durante todos esses anos de pesquisa. Agradeço por todos os momentos divertidos e por toda orientação dada, seja na vida acadêmica ou na minha vida pessoal. Não há uma palavra neste trabalho que não reflita todo o seu esforço e disposição.

Aos profs. Drs. João Batista e José Politi, pela oportunidade de crescer junto do LQC.

Por fim, agradeço a todos os fatores entrópicos que me trouxeram até aqui.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
a. DOENÇA DE ALZHEIMER	11
b. ACETILCOLINESTERASE	13
i. SÍTIO ATIVO GORGE	15
c. INIBIDORES DA AChE	17
i. INIBIDORES CLÁSSICOS DA AChE	18
ii. DONEPEZIL	18
iii. GALANTAMINA	18
iv. RIVASTIGMINA	19
v. DERIVADOS HÍBRIDOS	20
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
a. DRUG DESIGN	23
b. ADMET	23
c. DOCKING MOLECULAR	24
d. TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
a. ETAPAS ESPECÍFICAS	26
4. RESULTADOS	29
a. ADMET	30
b. DOCKING MOLECULAR	36
c. ESTRUTURA ELETRÔNICA	41
d. ÍNDICES DE REATIVIDADE DE FUKUI	45
e. INTERAÇÕES NÃO-COVALENTES (NCI)	48
5. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

a. DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa associada a cerca de 70% dos casos de demência, perda de memória e perdas cognitivas. Atualmente a demência é uma das principais causas de morte e causadora de dependência entre a população idosa mundialmente.^{1,2} Os principais sintomas associados aos casos de demência são: falhas motoras, problemas com comunicação e linguagem, perda de noção temporal e espacial, estados de confusão, entre outros.³ A DA é uma condição de progresso lento podendo levar décadas para atingir estágios mais avançados.⁴ Nestes casos, diversas partes do cérebro são afetadas, impedindo que a pessoa realize atividades diárias básicas, e com o avanço dos estágios da doença, leva o paciente a um estado vegetativo. Conforme a progressão da doença também há um decréscimo do gradiente de concentração dos neurotransmissores nos meios sinápticos, como a acetilcolina e a dopamina, e uma redução irreversível da massa encefálica, principalmente nas regiões responsáveis pela memória. Os lobos frontal e temporal, aqueles associados à memória, percepção, reconhecimento, linguagem, ações motoras, entre outros, são as partes do córtex cerebral que apresentam maior redução do tecido nervoso (Figura 1).^{5,6}

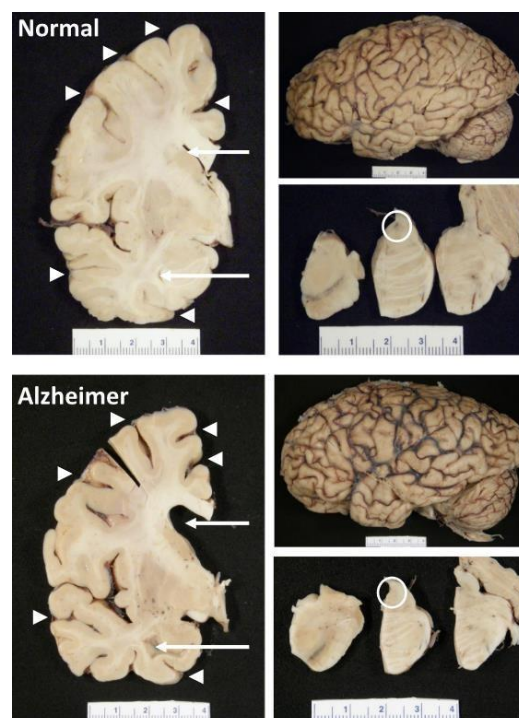


Figura 1. Efeitos macroscópicos da atrofia cerebral em pacientes com Alzheimer. As setas indicam o efeito da hipertrofia no aumento dos espaços sulcais. A perda de neurônios é observada pela mudança de coloração nas áreas circuladas.^{5,6}

A necessidade de estudar, debater, tratar e agir em relação à DA é emergente, principalmente pela estimativa de cerca de mais de 55 milhões de diagnósticos ao redor do mundo em 2019, com perspectivas de um aumento na casa dos 139 milhões de casos até 2050.⁷

Não existe uma única causa definida para o surgimento da DA, nem explicações para o aparecimento da doença, porém a descoberta de alguns biomarcadores que podem ser usados para orientação e diagnóstico.⁸ Um indicador útil é o aumento excessivo na expressão das proteínas tau e β -amilóide ($A\beta$) que têm seus níveis determinados por testes realizados com a extração de uma amostra do líquido cefalorraquidiano. Outro indicador é o uso de imagens médicas de ressonância nuclear magnética para identificar a diminuição na massa encefálica.⁹ Esses biomarcadores são utilizados, pois há evidências de que oligômeros da proteína $A\beta$ são capazes de se ligarem a receptores adrenérgicos que causam alterações na sinalização da noradrenalina. Essa alteração sintetiza a ativação patológica da hiperfosforilação da proteína tau, trazendo novos biomarcadores para a DA. Essas alterações levam à degradação e perda progressiva dos neurônios, pois ambas atrapalham a comunicação neural e/ou o transporte de nutrientes vitais para a célula neuronal. Outros sinais associados à DA são o estresse oxidativo, a inflamação e a perda da massa encefálica.¹⁰

Um diagnóstico definitivo da doença só pode ser feito de forma post-mortem e, é por isso que os biomarcadores citados anteriormente são importantes para essa finalidade. Atualmente, o protocolo consensual cita que o diagnóstico deve ser orientado por fatores neuropatológicos que causem mudanças como: surgimento de placas β -amilóides, emaranhado neurofibrilar causado pela proteína tau e o aparecimento de placas neuríticas.⁶

O avanço da DA pode ser avaliado em três diferentes estágios, considerando a piora dos sintomas em uma progressão lenta, indo desde sinais leves até a completa disfunção cerebral.¹ O primeiro estágio, chamado de estágio pré-clínico, abrange o momento prévio ao diagnóstico, onde há poucos sinais da doença, o paciente ainda é capaz de ser independente, apresentando os sintomas apenas de forma sutil. O estágio prodrômico é o estágio no qual o mal funcionamento cerebral fica mais evidente, podendo ser até notado por pessoas do convívio diário, facilitando assim o diagnóstico, pois o paciente não consegue realizar sozinho as atividades comuns do dia a dia, apresentando perda severa da memória de longo prazo, dificuldade na comunicação entre outros sintomas.¹¹

Uma das vias de tratamento para o Alzheimer, nos casos pós-clínicos, baseia-se na hipótese colinérgica. Essa hipótese afirma que a perda das funções colinérgicas contribui consideravelmente para a neurodegeneração e perda cognitiva observada em pacientes com DA. Concluindo que, essa perda seria causada pela drástica diminuição dos níveis de neurotransmissores disponíveis, incluindo

a acetilcolina (ACh), nos neurônios pré-sinápticos.¹² Em pacientes com um estado mais severo da DA, uma série de alterações nos sistemas de neurotransmissores foi observada no tecido nervoso, incluindo a diminuição na atividade da enzima responsável pela síntese da acetilcolina, a colina-acetiltransferase (ChAT). O decréscimo da atividade da ChAT está envolvido no decréscimo do número de neurônios colinérgicos e a redução na absorção da colina e na liberação de acetilcolina. Todos estes fatores aqui apresentados não estavam presentes de forma representativa em pacientes usados como controle, mesmo que idosos. Estes resultados mostram que há uma correlação entre as áreas do cérebro prejudicadas pelo Alzheimer e o mal funcionamento destes marcadores colinérgicos. Tais conclusões levaram à relação entre o avanço da doença com a degeneração das sinapses colinérgicas.¹³ Com essa hipótese, a primeira via terapêutica para a perda cognitiva causada DA se pautava numa estratégia que visa a reposição colinérgica. A abordagem com resultados mais significativos se dá utilizando inibidores da enzima acetilcolinesterase.¹²

b. ACETILCOLINESTERASE

Essa via de tratamento foca na inibição da acetilcolinesterase (AChE), a enzima responsável por hidrolisar a ACh em acetato e colina (Figura 2), visando aumentar a biodisponibilidade de ACh no meio sináptico e assim recuperar em parte o equilíbrio colinérgico alterado pelo avanço da DA.¹⁴

As colinesterases são um grupo de enzimas responsáveis por catalisar o processo de hidrólise de ésteres de colina, uma vez que as outras esterases disponíveis não atuam para tal fim. Existem dois tipos dessas enzimas: a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase, que se diferenciam no tipo de especificidade de cada substrato.¹⁵

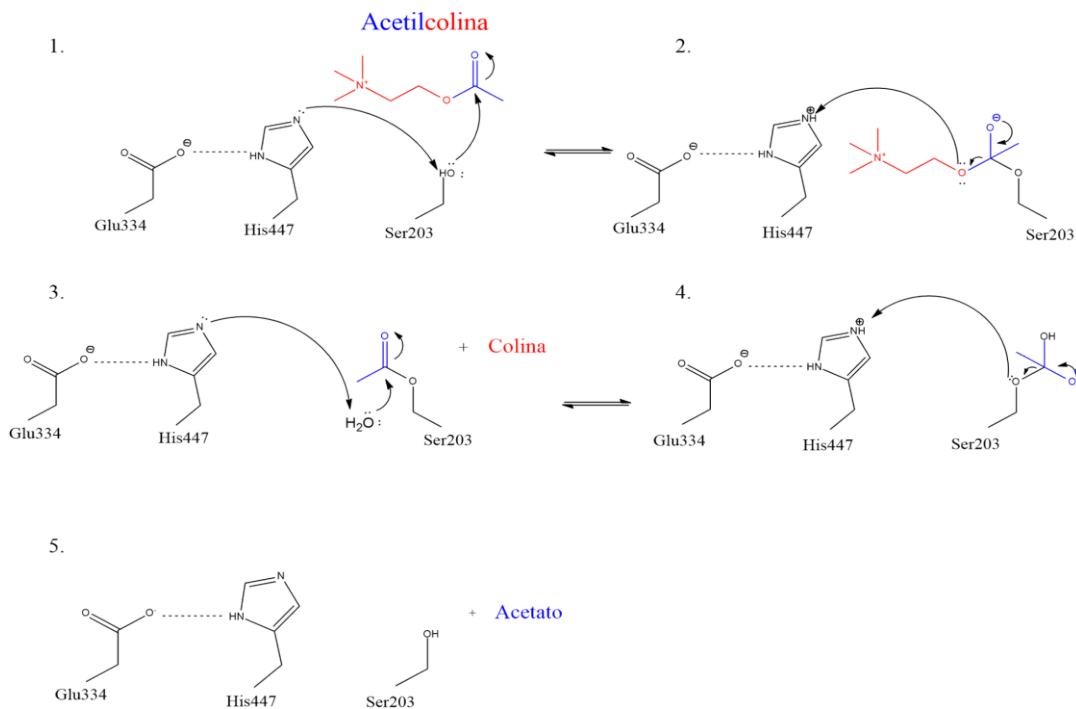


Figura 2 - Mecanismo de ação hidrolítica da AChE, adaptado.¹⁶

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima localizada majoritariamente nas juntas neuromusculares, fazendo a terminação do impulso nervoso, e liberando a colina para ser novamente acetilada permitindo a manutenção das sinapses no sistema nervoso.^{10,17} A AChE está catalogada sobre o número EC 3.1.1.7 no banco de dados Expsay. A enzima pertence ao grupo das $\alpha\beta$ proteínas, sua estrutura molecular consiste em 12 folhas- β e 14 α -hélices que resultam em mais de 500 aminoácidos, tendo seu sítio ativo com forte caráter hidrofóbico e muito bem definido por sua profundidade que penetra por quase toda a enzima.¹⁷ (Ver Figura 3)

Diferentes formas da enzima AChE podem ser encontradas em diversas espécies de seres vivos, tendo em alguns casos, estruturas oligoméricas similares àqueles presentes nos humanos. A primeira estrutura cristalina foi determinada em 1967, utilizando-se como fonte um peixe elétrico encontrado no mar vermelho, a *Torpedo californica* (TcAChE).¹⁸

A AChE se expressa em formas assimétricas e globulares. A forma assimétrica é caracterizada por ser formada com um, dois ou três tetrâmeros ligados covalentemente por um filamento de colágeno, esta forma é encontrada predominantemente nas junções neuromusculares e no tecido muscular de seres vertebrados.¹⁹ Já as formas globulares podem ser do tipo monoméricas (G1), diméricas (G2) ou tetramérica (G4), sendo essa última a mais abundante no cérebro, porém com um considerável decréscimo com o passar da idade, sendo, portanto, aquela que apresentará uma redução acelerada no caso de pacientes da DA. A forma G1 aparece em menor quantidade e tem sua expressão inalterada ou pouco reduzida.²⁰

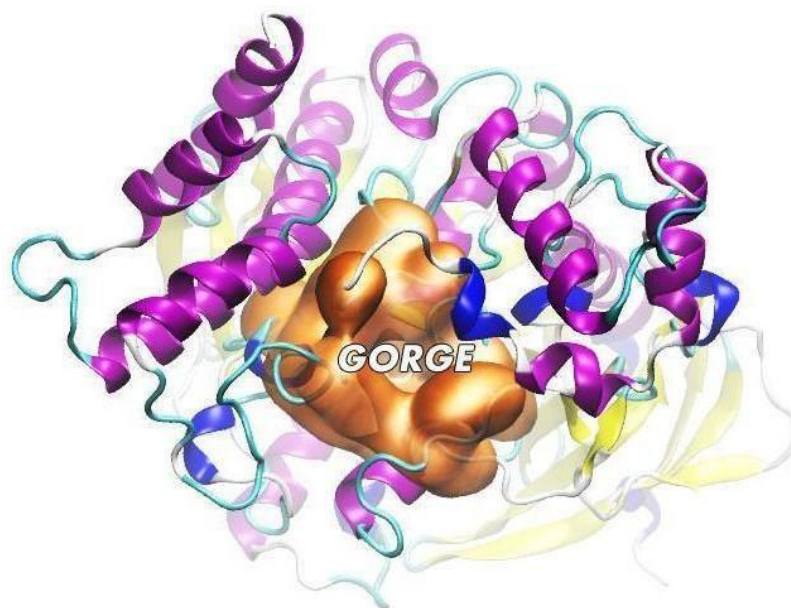


Figura 3 - Representação 3D em fita do monômero globular da AChE humana (Código PDB 6O4W), destaque em laranja para a região do sítio ativo da enzima, Gorge.²¹

i. SÍTIO ATIVO GORGE

A determinação da estrutura cristalina da *TcAChE*, possibilitou a primeira visualização 3D do seu sítio ativo (Figura 3), e permitiu o entendimento do mecanismo e da sua eficácia catalítica, além de impulsionar os estudos de aplicação e desenvolvimento de inibidores.¹⁷ Atualmente, estruturas cristalizadas da enzima recombinante humana já se encontram disponibilizadas nos bancos de dados.

O sítio ativo tem um formato de desfiladeiro, o que origina o seu nome Gorge. Com uma entrada estreita e repleta de resíduos aromáticos e uma alargada base do sítio, onde se encontra a sua tríade catalítica. Com profundidade estimada em 20 Å, é dividido em vários subsítios: o sítio periférico aniônico (PAS “peripheral anionic site”), sítio ligante de amônio quaternário (Ver figura 4e), bolsos de acilação, um sítio periférico aniônico e um sítio catalítico (CAS “catalytic active site”). Estes últimos contêm a tríade catalítica que está localizada na base constituída pelos Ser203, His447 e Glu334 (ver figura 4a), assim como um sítio aniônico, identificado por uma cavidade oxianiônica, formada pelos resíduos Gly120, Gly121, Gly122, Ala204, Glu202 e Tyr133 (Figura 4b).²¹

Próximo ao fundo do sítio, encontram-se os chamados bolsos de acilação formados pelos resíduos Ser125, Gly126, Ala127, Trp236, Phe338, Phe295 e Phe297 (Ver figura 4c). Na entrada do sítio, por fim, está localizado o subsítio periférico caracterizado pela presença de resíduos aromáticos. (Ver figura 4d)

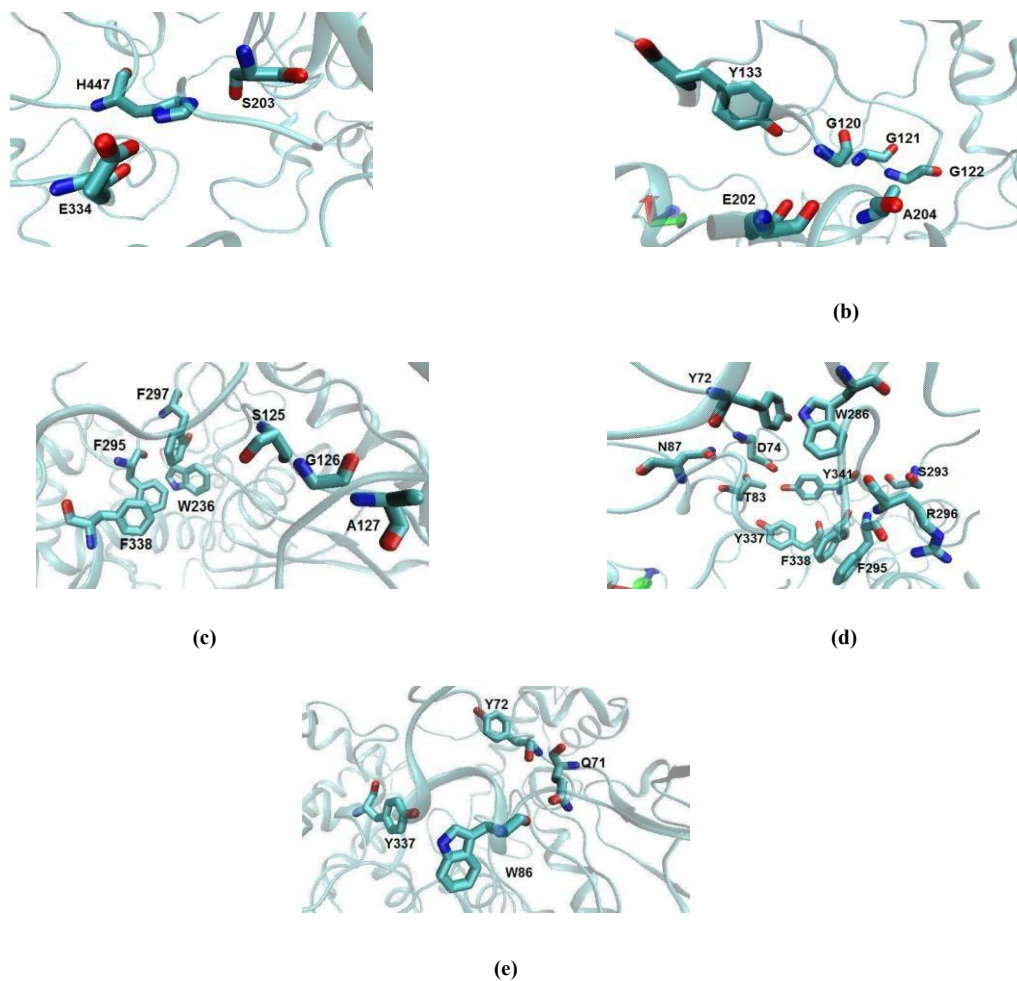


Figura 4. Sítio ativo da acetilcolinesterase humana (*hAChE*): (a) Sítio catalítico; (b) Sítio periférico aniônico; (c) Bolsos de acilação; (d) Sítio periférico aromático; (e) Sítio ligante de amônio quaternário (estrutura cristalográfica depositada sob o código PDB 6O4W)

De forma mais simplificada, podemos entender o Gorge dividido entre o sítio periférico aniônico (PAS) e um sítio catalítico (CAS).



Figura 5 - Representação gráfica do sítio (Gorge) ativo da AChE humana, adaptado.²²

c. INIBIDORES DA AChE

A inibição de uma enzima pode ocorrer de diferentes maneiras, levando em consideração os sítios de ação do ligante e a reversibilidade do processo. Inibições competitivas ocorrem quando o ligante e o substrato competem direta e mutuamente pelo mesmo ponto do sítio ativo, inibições não-competitivas ocorrem quando o ligante apresenta afinidade com a enzima livre e com o complexo enzima-substrato, e por fim, inibições incompetitivas são aquelas que ocorrem quando o ligante apresenta interações exclusivamente com o complexo enzima-substrato.²³

As inibições ainda podem ser classificadas a partir da sua reversibilidade. Uma inibição irreversível ocorre quando o ligante interage com alguma parte do sítio ativo de forma covalente, culminando numa reação direta. Em contrapartida, as inibições reversíveis se caracterizam por ligantes que interagem apenas intermolecularmente com o sítio ativo, seguindo uma reação que entra em equilíbrio químico.²³ Entretanto, processos inibitórios podem ser complexos e nem sempre poderão ser classificados nestes extremos, tornando a reversibilidade da inibição enzimática um espectro. Para a acetilcolinesterase, existem inibidores reversíveis, irreversíveis e os chamados pseudo-irreversíveis. As inibições chamadas pseudo-irreversíveis ocorrem principalmente com ligantes que mimetizam a acetilcolina e são hidrolisados pela AChE, porém numa velocidade muito menor.²³

i. INIBIDORES CLÁSSICOS DA AChE

Atualmente, três fármacos têm seu uso aprovado para o tratamento da DA pelo *U.S's Food and Drug Administration* (FDA), sendo eles o donepezil, a galantamina e a rivastigmina. No Brasil, os mesmos são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e são amplamente usados no tratamento da doença. Outro fármaco para o tratamento da doença é a tacrina. Apesar de aprovada em 1993 e ter uma efetiva ação inibitória, esse fármaco, que foi o primeiro inibidor proposto, teve seu uso revogado após mostrar severos efeitos colaterais relacionados a sua hepatotoxicidade. No Brasil, teve seu consumo e comercialização suspenso oficialmente em 2019.^{24, 25}

ii. DONEPEZIL

O donepezil (fórmula química $C_{24}H_{29}NO_3$, com nomenclatura na IUPAC 2-[(1-benzylpiperidin-4-yl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-one, nº CAS 120014-06-4 e comercializado no Brasil como Lábrea®)²⁶ apresenta 2 anéis aromáticos e um grupo piperidino em sua estrutura molecular (Ver figura 6a). O donepezil interage com os resíduos aromáticos do sítio periférico e do sítio ligante de amônio quaternário do sítio Gorge da *hAChE*, sendo assim um ligante não-competitivo e reversível, recomendado para todos os estágios de progressão da DA.²⁷

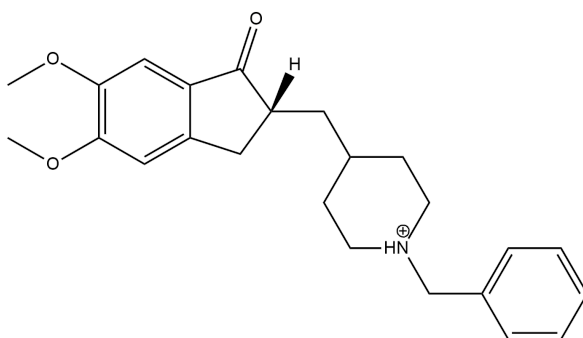


Figura 6 - Estrutura molecular 2D da donepezila

iii. GALANTAMINA

A galantamina é um fármaco utilizado para o tratamento de diversas patologias cerebrais, teve suas propriedades inibitórias frente a AChE descobertas na década de 1950 e seu uso aprovado para tratar a DA no ano de 2001. Sua fórmula química é a $C_{17}H_{21}NO_3$, com nomenclatura na IUPAC (1*S*,12*S*,14*R*)-9-methoxy-4-methyl-11-oxa-4-azatetracyclo[8.6.1.0^{1,12}.0^{6,17}] heptadeca-6(17),7,9,15-tetraen-14-ol, nº CAS 357-70-0, e é um fármaco comumente comercializado no Brasil como Coglive®)²⁸ Devido sua versátil estrutura geométrica, a galantamina apresenta as interações mais

intensas com os resíduos dos bolsos de acilação na base e com o sítio ligante de amônio quaternário. Com destaque para interações do seu alcalóide terciário, com resíduos de aminoácidos do sítio periférico da *hAChE*, sendo assim, um ligante competitivo reversível, recomendado para estágios leves e moderados de demência.²⁹

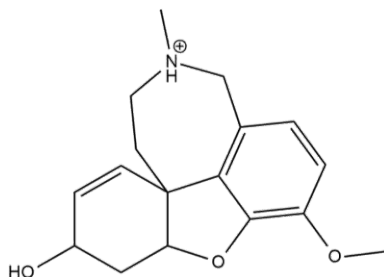


Figura 7. Estrutura molecular 2D da galantamina.

iv. RIVASTIGMINA

A rivastigmina, é um fármaco aprovado no ano de 2000 (fórmula química $C_{14}H_{22}N_2O_2$, com nomenclatura IUPAC [3-[(1*S*)-1-(dimethylamino)ethyl]phenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate, nº CAS 123441-03-2 e comumente comercializado no Brasil como Exelon®)³⁰. É um inibidor do grupo do carbamato, que interage diretamente com os resíduos da tríade catalítica na base do sítio Gorge. Principalmente com a Ser200, provocando perturbações nos His440 e Glu327 da *TcAChE*. Sendo assim, é um ligante competitivo pseudoreversível, recomendado para estágios leves e moderados de demência, incluindo casos de doença de Parkinson.³¹

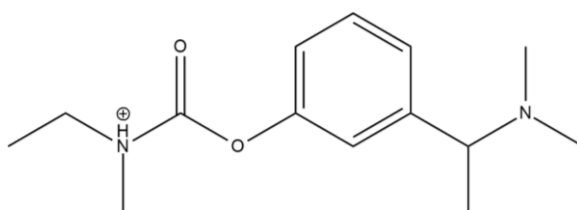


Figura 8. Estrutura molecular 2D da rivastigamina.

v. DERIVADOS HÍBRIDOS

1. LADOSTIGIL

O ladostigil (LDG/TV3326) é um fármaco que se encontra em teste de fase clínica IIb. Fórmula química, $C_{16}H_{20}N_2O_2$, de nomenclatura IUPAC [(3R)-3-(prop-2-ynylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-5-yl] N-ethyl-N-methylcarbamate. É multifuncional, podendo ser usado no tratamento de várias doenças neurodegenerativas como o estresse oxidativo, depressão, e mal de Parkinson. Também é aplicado como um inibidor da AChE e da monoamina oxidase (MAO), podendo ser assim usada como tratamento da DA e da demência causada por corpos de Lewy.³²

Sua estrutura é uma combinação do carbamato presente na estrutura química da rivastigmina, um inibidor da AChE e da butirilcolinesterase (BuChE), e do anel aminoindano presente na estrutura química da rasagilina, um inibidor seletivo da MAO. Sendo assim, é usado para melhorar casos onde o estado depressivos foi estabelecido, além das atividades das sinapses colinérgicas, e diminuir a formação das chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), entre outros.³³

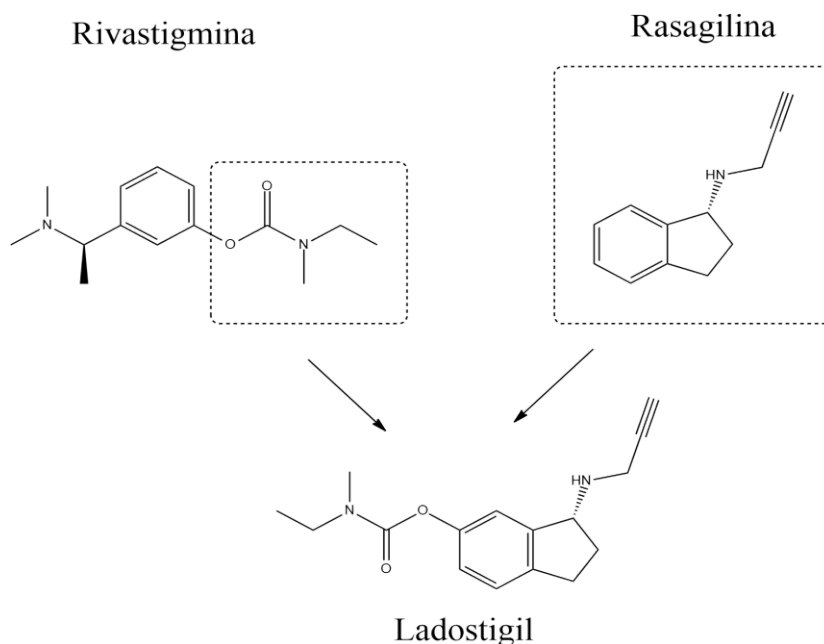


Figura 9 - Estrutura molecular 2D do ladostigil.

2. HUPRINA

Esse candidato a inibidor é a combinação de dois inibidores da AChE, a tacrina e a huperzina A, um alcalóide extraído do musgo dentado *Huperzia serrata*, usado na medicina asiática tradicional para tratamento de perda de memória, inchaço, dores, etc.¹⁴ Esta junção originou um vasto leque de novos potenciais inibidores da AChE, as chamadas huprinas. Essa combinação permitiu um rápido desenvolvimento de múltiplas novas estruturas que tem como foco a inibição da AChE e da BuChE.³⁴

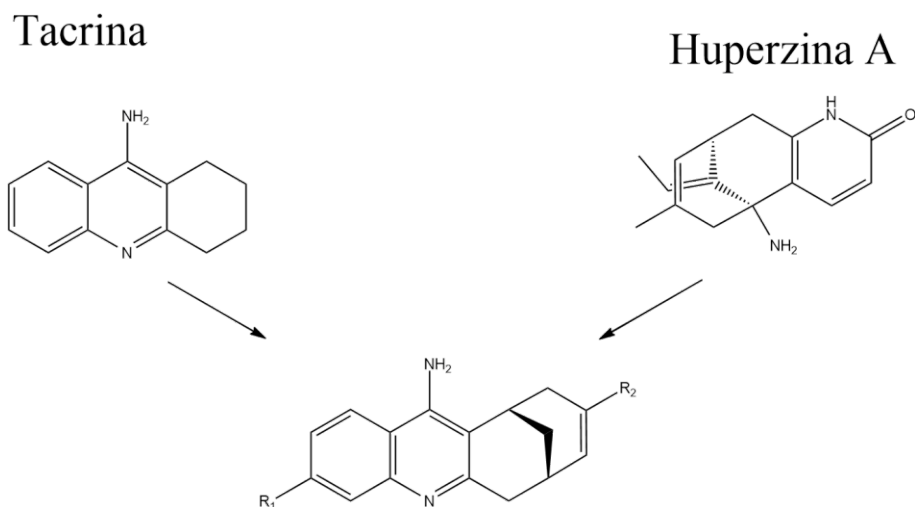


Figura 10 - Estrutura molecular 2D geral das huprinas.

A síntese das huprinas, com essas diversas mudanças estruturais, mostraram que esses novos inibidores possuem ótimos potenciais inibitórios *in vivo* e *in vitro* em relação à AChE. Grupos alquila, arila ou fenila são muito comuns na posição R₂ (Figure 10), enquanto estudos mostram que a adição de um átomo de cloro na posição R₁ potencializa a atividade inibitória.⁵ Assim, a huperzina W (HUW) se caracteriza por ter um cloreto e um grupo -CH₂CH₂OH como seus substituintes.³⁶

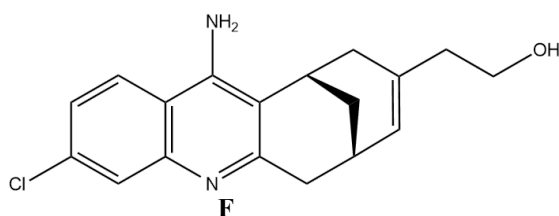


Figura 11 - Estrutura molecular 2D da huperzina W

3. NOVOS HÍBRIDOS

A busca por novas moléculas com melhor performance e eficiência no tratamento da DA é incessável e urgente. Uma via terapêutica mais efetiva pode ser traçada através de moléculas com múltiplas funções em uma só unidade molecular. Assim, a busca por moléculas híbridas com múltiplos alvos e múltiplas ações biológicas são uma forte e promissora área para avanços no tratamento da doença.³⁷

Uma forma de se obter novas estruturas é através das técnicas de bioisosterismo. Nesta técnica, ocorre a modificação estrutural das moléculas, considerando novos grupos, compostos ou funções que

apresentam alguma semelhança entre si, como por exemplo, sua atividade biológica.³⁸ Dentre as várias possibilidades foi escolhida a heterodimerização, ou seja, a formação de um novo composto partindo de duas subunidades diferentes. Isto gera então um ligante bivalente, ligado através de um grupo de ponte que visa uma maior afinidade com seu alvo bioquímico.^{39,40} Estes compostos muitas vezes se comportam como inibidores de múltiplos alvos, uma vez que continuam atuando com sua propriedade inibitória original.⁴¹

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

a. DRUG DESIGN

Moléculas que se enquadram como fármacos são aquelas que afetam, de alguma forma, algum processo biológico e metabólico visando o funcionamento ideal do corpo humano. Idealmente, estas moléculas devem apresentar baixa toxicidade, fácil acesso, alta solubilidade em meio fisiológico, ter uma alta especificidade, entre outras propriedades desejadas.⁴²

A descoberta de novos fármacos é sempre emergente e está sempre sob alta demanda. Existem três abordagens clássicas para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo essas:

- 1- A descoberta ao acaso, ou seja, quando a função farmacológica de alguma molécula é determinada sem que esta fosse a intenção inicial ou por tentativa e erro;
- 2- alterações estruturais em moléculas com ação farmacológica já conhecido;
- 3 - desenho racional de novas moléculas.⁴²

O desenho racional se pauta na identificação de alvos biológicos associados à doença que o fármaco visa tratar, permitindo assim, que o mecanismo de ação desejado seja conhecido e que novas moléculas sejam desenhadas do zero ou não. Para isso, as propriedades destas novas moléculas devem ser extensamente estudadas, visando entender teoricamente como essa nova proposta irá se comportar no fisiológico.⁴³

Quando o alvo bioquímico já é conhecido, o desenho racional pode ser facilmente auxiliado pelas ferramentas de bioinformática, uma vez que o ligante pode ser desenhado visando diferentes propriedades. Métodos computacionais ajudam a prever certos comportamentos como afinidade com o sítio ligante, propriedades físico-químicas, entre outras.⁴⁴ Após o desenvolvimento ou descoberta de uma nova molécula com potencial ação bioquímica, esta passa para futuras etapas de desenvolvimento pré-clínico e testes clínicos.⁴²

b. ADMET

As propriedades de um fármaco podem ser previstas sem necessariamente passar por testes *in vitro*. Para isto, o estudo das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET) devem ser realizados para entender se uma molécula com potencial

farmacológico irá atingir seu alvo, se a molécula será capaz de manter a biodisponibilidade na corrente sanguínea, seu comportamento farmacocinético, etc.⁴⁵

Estudos ADMET viabilizam a descoberta de novos candidatos a fármacos uma vez que auxiliam na seleção das melhores moléculas propostas, minimiza as possíveis falhas e permite priorizar quais moléculas devem e podem ser sintetizadas para testes *in vitro*.⁴⁶

c. DOCKING MOLECULAR

A ação de qualquer molécula em meio biológico é regulada pelo reconhecimento molecular entre o alvo proteômico e o ligante. Para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, é importante que este reconhecimento e a eventual interação entre o complexo seja conhecido e muito bem estudado. Uma forma de reduzir o custo e abreviar muitos riscos de testes clínicos, é o chamado docking molecular.⁴⁷

Docking molecular é uma técnica de simulação computacional capaz de prever a forma que o complexo formado entre um alvo, comumente uma enzima, e um ligante irá se orientar espacialmente. Este complexo consegue ser determinado levando em consideração as interações que ocorrem entre o ligante e as partes do sítio ao qual ela se liga da macromolécula usada como alvo. Assim, o método é capaz de prever as conformações possíveis, as distâncias e as energias de interação do complexo. Simulações de docking molecular também são efetivas em reproduzir dados empíricos como forma de validação dos dados obtidos cristalograficamente.⁴⁸

d. TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE

Com os avanços científicos realizados na química quântica, diferentes formas de se propor tratamentos da equação de Schrödinger surgiram com o tempo. A teoria do funcional de densidade (DFT) visa facilitar a obtenção de informações de sistemas poliatômicos ao fazer uma aproximação baseada exclusivamente na densidade eletrônica do sistema. Em princípio, a densidade eletrônica seria capaz de fornecer todas as informações que seriam obtidas através da densidade de um sistema molecular.⁴⁹

Cálculos de estrutura eletrônica que utilizam este método são capazes de prever geometrias e conformações otimizadas, valores de energia, distribuição dos orbitais de fronteira das moléculas, mecanismos de reação e até mesmo informações sobre frequências vibracionais e diferentes formas de espectroscopia. O uso da DFT para o estudo de sistemas biológicos é extenso e bem estabelecido. Os avanços obtidos por meio desta permitem determinar propriedades com bastante exatidão, podendo confirmar, complementar e propor estudos empíricos. Isto permite também que estudos que utilizam a DFT sejam capazes de explorar novos sistemas e modelar novas estruturas.⁵⁰

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os objetivos deste estudo consistem em desenhar e estudar computacionalmente novos candidatos a inibidores híbridos heterodiméricos da *hAChE* formados a partir de seus inibidores clássicos. O estudo foi realizado por meio da aplicação de técnicas de modelagem molecular de bioisosterismo, suas propriedades ADMET, docking molecular, estudo de estrutura eletrônica, índices de reatividade química e de Fukui, e o estudo de interações não-covalentes (NCI) visando observar as interações dos novos candidatos a inibidores com os resíduos do PAS e o CAS da *hAChE*.

Para que estes objetivos fossem atingidos, o desenvolvimento do trabalho foi dividido em 6 fases, que estão descritas a seguir

a. ETAPAS ESPECÍFICAS

- **DESENHO RACIONAL DAS MOLÉCULAS**

Na primeira etapa foram desenhados 5 novos candidatos a inibidores híbridos da AChE. A primeira técnica de *drug design* escolhida para esta etapa foi a heterodimerização. A escolha dos monômeros se fundamentou na ideia de escolher inibidores potentes e clássicos da AChE, com mecanismo de interação já estabelecido. A escolha da huprina W pautou-se no potencial crescente que esta classe de inibidores já demonstrou, além de terem apresentado uma série de estudos e usos em técnicas de hibridização e dimerização. O ladostigil é um fármaco de potencial crescente, resultante do uso de técnicas de hibridização, extensa bibliografia e ação para diferentes alvos terapêuticos.

Escolhidos os monômeros, o desenho das novas moléculas começou pela seleção das partes a serem mantidas nos híbridos. Estas partes foram conectadas entre si através de uma cadeia carbônica acíclica que funcionaria como grupo de ponte. Os tamanhos sugeridos para essa cadeia visavam compensar a densidade eletrônica que havia sido retirada nas partes que foram excluídas da molécula de partida.

Uma vez com os heterodímeros prontos, usando as técnicas de bioisosterismo, uma alteração nas moléculas seria realizada variando a função orgânica presente nos grupos de ponte, podendo ser: alcanos, amidas, cetonas, ésteres e éteres.

- **ESTUDO DAS PROPRIEDADES ADMET**

O desenho e construção das estruturas das moléculas sugeridas, foi realizado no software ChemDraw Ultra 12.0.⁵¹ A partir do desenho, o código SMILES foi gerado por uma ferramenta do mesmo software. Com os códigos SMILES gerados, utilizando o website que contém o programa para estudos de ADME, o SwissADME⁴⁵, as estruturas dos novos heterodímeros foram submetidas para análise, e informações sobre as propriedades físico-químicas, farmacocinética, druglikeness, biodisponibilidade, entre outros dos ligantes propostos.

- **DOCKING MOLECULAR**

Para determinar as energias de interação entre as novas moléculas e a AChE, o método adotado foi o de estudo de docking molecular. A estrutura cristalográfica da proteína foi obtida através do *Protein Data Bank* (PDB), onde há depositada uma estrutura 3D da AChE humana sob o código PDB 6O4W, complexada com a molécula de donepezil. Esta foi escolhida uma vez que, entre todas estruturas da hAChE depositadas no PDB, ela apresenta uma resolução de 2,35 Å, um dos menores valores de resolução de estrutura cristalográfica estudada por difração de raio X para a AChE. As estruturas tridimensionais dos ligantes foram construídas a partir das estruturas tridimensionais de seus monômeros de partida, com as ferramentas do software de visualização GaussView 5.0⁵².

Os softwares utilizados para os estudos de docking molecular foram o MGLTools⁵³ e o AutoDock Tools⁵⁴, usando os algoritmos AutoDock 4.2.26. Através deles, as estruturas proteicas e os ligantes foram preparados para os estudos. Primeiramente, foram estabelecidos protocolos para os cálculos de docking, como tamanho da *gridbox*, número de soluções, tamanho populacional e número de avaliações. Os resultados obtidos por meio do estudo de docking foram utilizados para extrair as coordenadas das conformações energeticamente mais estáveis dos resíduos de aminoácidos da enzima que estejam contribuindo de forma mais efetiva para a formação do complexo. Para uma primeira sondagem, os cálculos foram realizados considerando o sistema proteína/ligante como rígido/flexível. Após a otimização das estruturas dos ligantes com métodos quânticos, os cálculos de docking foram realizados com o sistema rígido/rígido.

- **ESTRUTURA ELETRÔNICA**

Cálculos de estrutura eletrônica usando o método da teoria do funcional de densidade (DFT), com o funcional híbrido B3LYP e a função de base 6-311+G** foram realizados considerando duas condições: estando os ligantes no vácuo e em meio solvatado. Para o meio solvatado, o método aplicado foi o de solvatação implícita SMD (Solvent Model Density) tendo a água como solvente. Todos estes cálculos foram submetidos a partir da estrutura 3D dos ligantes obtidas anteriormente

para determinar energia total, momento de dipolo, carga dos heteroátomos e dos hidrogênios mais ácidos, energias dos orbitais de fronteira HOMO, HOMO -1, HOMO -2, LUMO, LUMO +1 e LUMO +2, assim como o valor do gap ($E_{LUMO}-E_{HOMO}$), das estruturas protonadas de cada um dos ligantes. Os cálculos também forneceram a conformação das moléculas de menor energia a partir de cálculos de otimização.

- **ÍNDICES DE REATIVIDADE DE FUKUI**

Através das funções de Fukui e a partir dos arquivos gerados nos cálculos da DFT, os ligantes foram classificados em termos de suas reatividades e tiveram algumas propriedades determinadas. Para isso, os valores de HOMO e LUMO obtidos pelos cálculos de estrutura eletrônica de cada estrutura, suas reatividades a partir da eletronegatividade, durezas e maciez global, eletrofilicidades e potenciais químicos foram determinados. Todos os resultados aqui foram obtidos a partir do software Multiwfn⁵⁵, um programa capaz de analisar funções de onda eletrônicas.

- **INTERAÇÕES NÃO-COVALENTES (NCI)**

Os resultados obtidos nos estudos de docking fornecem as coordenadas da melhor conformação do ligante quando complexado ao sítio ativo da enzima. Assim, um estudo das ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e outras, ou seja, interações não-covalentes (NCI) presentes no complexo foi realizado. Para isso, o software Multiwfn foi usado. Deste modo, através da densidade eletrônica dos sistemas proteína-ligante obtidos nos estudos de docking molecular deste trabalho, foram estudadas as NCI presentes nesse sistema e como elas afetam a afinidade do sistema.⁵⁶

4. RESULTADOS

Para que a capacidade inibitória dos ligantes aqui propostos fosse avaliada, o trabalho iniciou-se com o desenho racional de novas moléculas a partir das técnicas de modelagem molecular. Com este fim, a primeira etapa pautou-se no uso de técnicas e softwares de modelagem molecular para que as estruturas fossem obtidas bi e tridimensionalmente.

O esquema a seguir apresenta a estratégia utilizada a partir da heterodimerização e bioisosterismo para o desenho das estruturas.

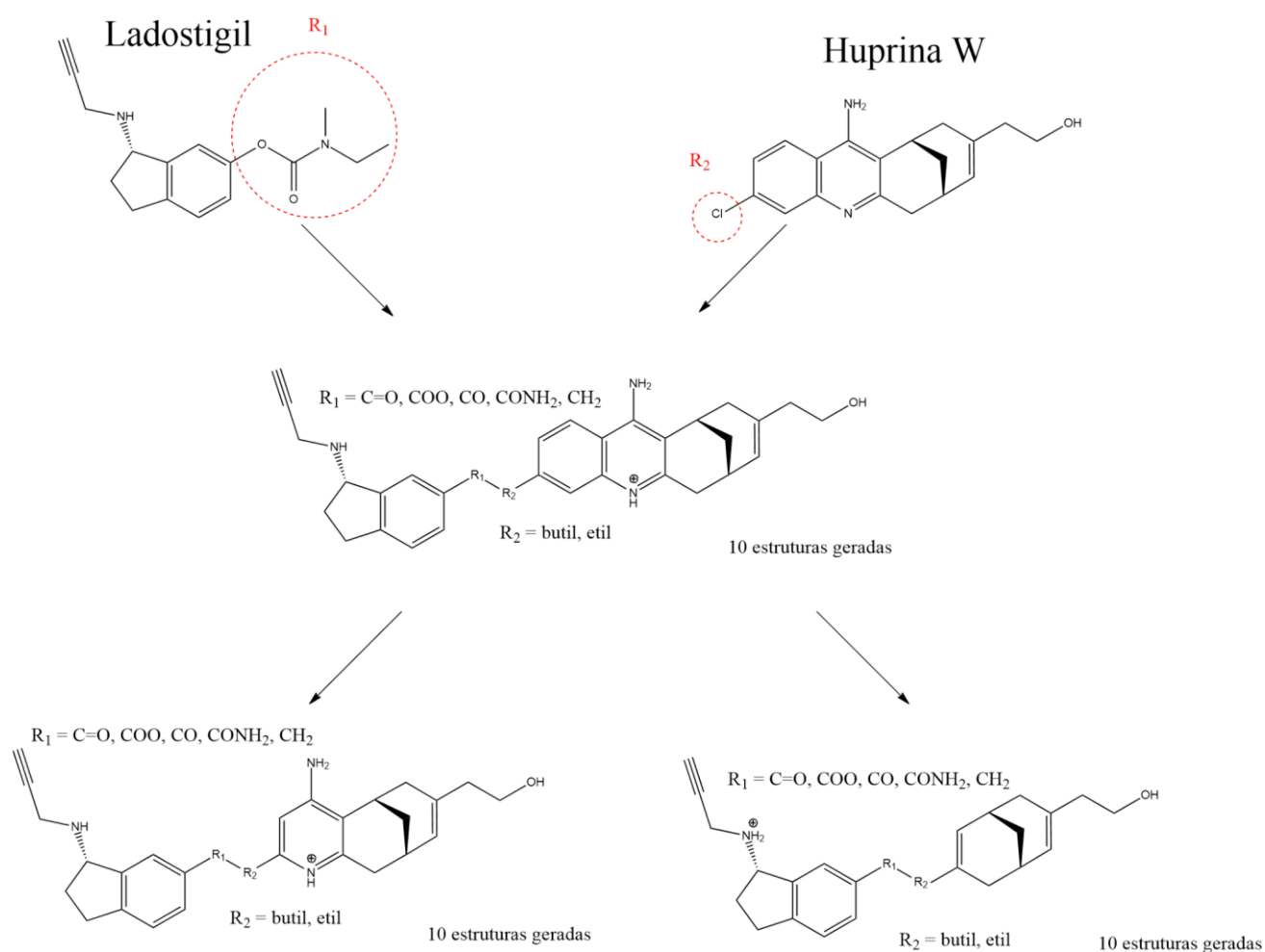


Figura 12. Esquema da heterodimerização usada no desenho das 30 moléculas propostas.

Priorizando a presença de anéis aromáticos nos novos híbridos, do ladostigil foi incorporado a parte aminoindano, já da huprina w foram conservados seus anéis e sua terminação alcoólica.

Para conectar os dois monômeros, foi adicionado um grupo de ponte variável. Este grupo de ponte variou em número de carbonos da cadeia e na função orgânica nele presente. Em todas as

etapas, esta variação foi utilizada, onde o grupo podia conter 3 ou 5 carbonos e as funções orgânicas presentes podiam ser: amida, cetona, éster, éter ou apenas uma ponte com carbonos e hidrogênios. Na Etapa 1, todos os anéis da HUW foram mantidos e ligados ao monômero do LDG.

Na Etapa 2, visando diminuir a densidade eletrônica da molécula híbrida, um dos anéis aromáticos da HUW foi removido e o monômero do LDG foi ligado usando o mesmo grupo de ponte variável aplicado na Etapa 1. Na Etapa 3, para os mesmos fins que anteriormente, dois anéis aromáticos da HUW foram removidos. O restante da HUW foi ligado ao monômero do LDG com o grupo de ponte variável utilizado anteriormente.

Para o desenho bidimensional das estruturas, que seriam utilizadas para os estudos ADMET, foi utilizado o software ChemDraw e para as estruturas tridimensionais, o software utilizado foi o GaussView 5.0, estas por sua vez foram destinadas para todos os estudos de docking, estrutura eletrônica, índices de reatividade de Fukui e NCIpro.

a. ADMET

Considerando a finalidade deste estudo, as principais propriedades a serem levadas em consideração foram aquelas que viabilizam a possibilidade destas moléculas serem utilizadas para fins farmacológicos (Tabelas 1-4). Propriedades como a capacidade de absorção gastrointestinal (AGI), a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), as violações à Regras de Lipinski (RoF), biodisponibilidade e viabilidade sintética eram, portanto, essenciais que obtivessem bons resultados.

Os resultados obtidos estão contidos nas tabelas a seguir e representados no gráfico através do método *Brain Or Intestinal EstimateD permeation method* (BOILED-Egg)³⁴

Tabela 1. Resultado do estudo ADMET de 15 dos ligantes propostos

		Monômero HUW			Propriedades físico-químicas
		4 anéis	3 anéis	2 anéis	
Grupo de ponte com 5 carbonos	Amida	549,73	499,67	433,61	MM
		5	5	3	Hdoador
		3	3	2	Haceptor
		101,52	101,52	65,94	TPSA
		4,79	3,81	3,41	lopP
	Cetona	534,71	484,65	419,60	MM
		4	4	2	Hdoador
		3	3	3	Haceptor
		91,14	91,14	49,33	TPSA
		4,59	3,58	5,05	lopP
	Éster	550,71	500,65	435,60	MM
		4	4	2	Hdoador
		4	4	4	Haceptor
		100,37	100,37	58,56	TPSA
		4,54	3,59	4,96	lopP
		536,73	486,67	420,61	MM
		4	4	2	Hdoador
		3	3	2	Haceptor
		83,30	83,30	46,07	TPSA
		4,94	4,00	4,17	lopP
Alcano	520,73	470,67	404,61	MM	
	4	4	2	Hdoador	
	2	2	1	Haceptor	
	72,42	72,42	36,84	TPSA	
	5,92	4,90	4,48	lopP	

Tabela 2. Resultado do estudo ADMET de 15 dos ligantes propostos

		Monômero HUW			Propriedades físico-químicas
		4 anéis	3 anéis	2 anéis	
	Amida	521,67	471,61	405,55	MM
		5	5	3	Hdoador
		3	3	2	Haceptor
		101,52	101,52	65,94	TPSA
		4,13	3,20	2,75	logP
	Cetona	506,66	456,60	390,54	MM
		4	4	2	Hdoador
		3	3	2	Haceptor
		91,14	91,14	53,91	TPSA
		3,94	2,94	3,14	logP
Grupo de ponte com 3 carbonos	Ester	522,66	458,57	406,54	MM
		4	4	2	Hdoador
		4	4	3	Haceptor
		100,37	100,37	63,14	TPSA
		3,91	3,21	3,12	logP
	Eter	508,67	458,62	392,55	MM
		4	4	2	Hdoador
		3	3	2	Haceptor
		83,30	83,30	46,07	TPSA
		4,28	3,29	3,52	logP
Alcano	492,67	442,62	376,55	MM	
	4	4	2	Hdoador	
	2	2	1	Haceptor	
	72,42	72,42	36,84	TPSA	
	5,19	4,10	3,84	logP	

Legenda: MW = massa molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); Hdoador = número de ligações de hidrogênio doadoras; Haceptor = número de átomos aceptores de ligações de hidrogênio, TPSA = área de superfície polar (Å^2); logP = coeficiente de partição octanol/água

Tabela 3. Resultado do estudo ADMET de 15 dos ligantes propostos

		Monômero HUW			
		4 anéis	3 anéis	2 anéis	Farmacocinética
Amida	Alta	Alta	Alta	Alta	AGI
	Não	Não	Não	Sim	PBHE
	1 violação	0 violações	0 violações	0 violações	ROF
	0,55	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
	5,79	5,55	5,29	5,29	Acessibilidade sintética
Cetona	Alta	Alta	Alta	Alta	AGI
	Não	Não	Não	Sim	PBHE
	1 violação	0 violações	0 violações	1 violação	ROF
	0,55	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
	5,75	5,57	5,48	5,48	Acessibilidade sintética
Grupo de ponte com 5 carbonos	Alta	Alta	Alta	Alta	AGI
	Não	Não	Não	Sim	PBHE
	2 violações	1 violação	1 violação	1 violação	ROF
	0,17	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
	5,89	5,68	5,69	5,69	Acessibilidade sintética
	Alta	Alta	Alta	Alta	AGI
	Não	Não	Não	Sim	PBHE
	2 violações	0 violações	0 violações	0 violações	ROF
	0,71	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
	5,93	5,72	5,48	5,48	Acessibilidade sintética
Eter	Alta	Alta	Alta	Alta	AGI
	Não	Sim	Sim	Sim	PBHE
	2 violações	0 violações	0 violações	0 violações	ROF
	0,17	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
	5,81	5,60	5,37	5,37	Acessibilidade sintética
Alcano	Alta	Alta	Alta	Alta	AGI
	Não	Sim	Sim	Sim	PBHE
	2 violações	0 violações	0 violações	0 violações	ROF
	0,17	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
	5,81	5,60	5,37	5,37	Acessibilidade sintética

Tabela 4. Resultado do estudo ADMET de 15 dos ligantes propostos

		Monômero HUW			Farmacocinética
		4 anéis	3 anéis	2 anéis	
Amida	Alta	Alta	Alta	Alta	AGI
	Não	Não	Não	Sim	PBHE
	1 violação	0 violações	0 violações	0 violações	ROF
	0,55	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
	5,55	5,35	5,35	5,15	Acessibilidade sintética
Cetona	Alta	Alta	Alta	Alta	AGI
	Não	Não	Não	Sim	PBHE
	1 violação	0 violações	0 violações	0 violações	ROF
	0,55	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
	5,52	5,35	5,35	5,15	Acessibilidade sintética
Grupo de ponte com 3 carbonos	Éster	Alta	Alta	Alta	AGI
		Não	Não	Sim	PBHE
		1 violação	0 violações	0 violações	ROF
		0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
		5,64	5,40	5,30	Acessibilidade sintética
	Éter	Alta	Alta	Alta	AGI
		Não	Não	Sim	PBHE
		1 violação	0 violações	0 violações	ROF
		0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade
		5,67	5,49	5,27	Acessibilidade sintética
Alcano	Alta	Alta	Alta	AGI	
	Não	Sim	Sim	PBHE	
	1 violação	0 violações	0 violações	ROF	
	0,55	0,55	0,55	Biodisponibilidade	
	5,56	5,39	5,15	Acessibilidade sintética	

Legenda: AGI = absorção gastrointestinal; PBHE = permeabilidade na barreira hematoencefálica; ROF = violações à regra de Lipinski.

A avaliação destas propriedades mostra que a criação destas moléculas híbridas acaba por distanciá-los de seus ligantes originais em termos de propriedades. Em todos, um comportamento semelhante ocorreu ao apresentarem um aumento da massa molecular, da sua área de superfície polar

e sua lipofilicidade, o que alterou as propriedades farmacocinéticas dos ligantes. Estas propriedades afetam diretamente a forma em que o híbrido irá estar biodisponível no corpo humano.

Os resultados aqui expostos permitiram que uma primeira filtragem dos ligantes fosse realizada. Considerando que os ligantes têm finalidade de ação no tecido nervoso e ação farmacológica de inibidor da AChE, é essencial que os ligantes apresentem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e que obedeçam à Regra de Lipinski (RoF). Enquanto o aumento da TPSA ditou as moléculas que eram capazes de ter resultados positivos ao atravessar a BHE, o aumento da lipofilicidade e da massa molecular fizeram com que os ligantes começassem a violar os parâmetros da RoF.

Assim, das 30 novas estruturas propostas, 12 candidatas estão aptas a seguir no estudo do seu potencial como novos inibidores da acetilcolinesterase humana. O gráfico BOILED-Egg a seguir resume os resultados aqui descritos.

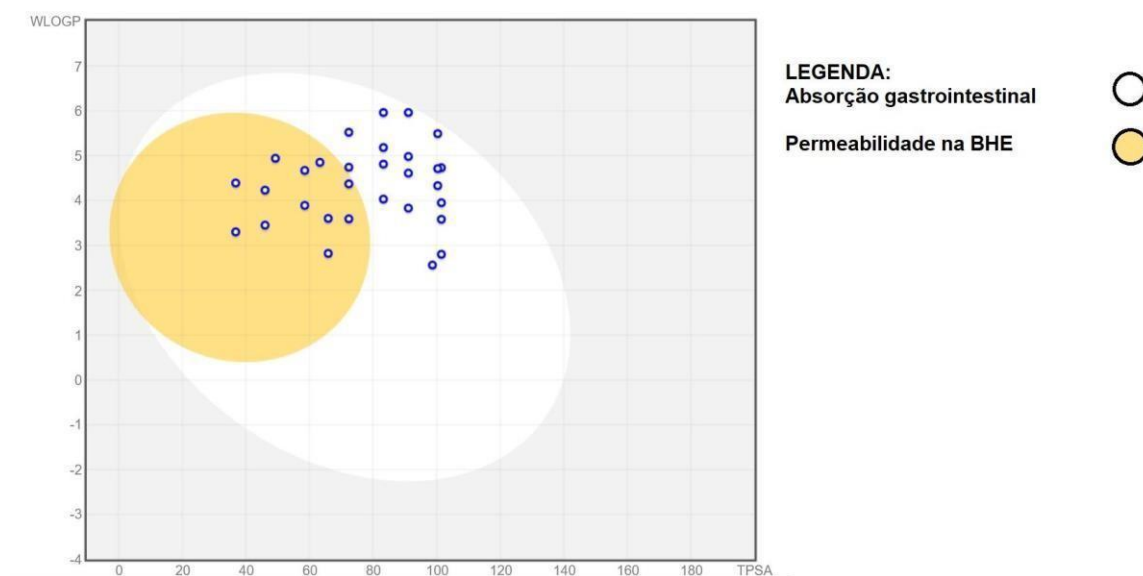


Figura 13. Gráfico BOILED-Egg de todas as 30 moléculas propostas.

Destas 12 moléculas, 10 apresentavam baixa TPSA por terem tido o anel aromático nitrogenado da huprina w removido, enquanto as outras 2 tiveram seu TPSA reduzido por não apresentar heteroátomos no seu grupo de ponte. Desta forma, o comportamento geral que permitia a passagem na BHE era ditado pela remoção dos anéis de alta densidade eletrônica, sendo assim, apenas os 10 candidatos desenvolvidos na etapa 3 seguiram no estudo.

b. DOCKING MOLECULAR

Para entender o processo de inibição que cada um dos ligantes selecionados têm com o sítio ativo da enzima, assim como suas distâncias de ligação, tipo de interação, entre outros, cálculos de docking molecular rígido/flexível com a proteína de código PDB 6O4W usando apenas o algoritmo LGA do AutoDock4 foram realizados obtendo os seguintes resultados para os 10 diferentes ligantes desenvolvidos na Etapa 3.

Os resultados obtidos estão expressos no gráfico a seguir.

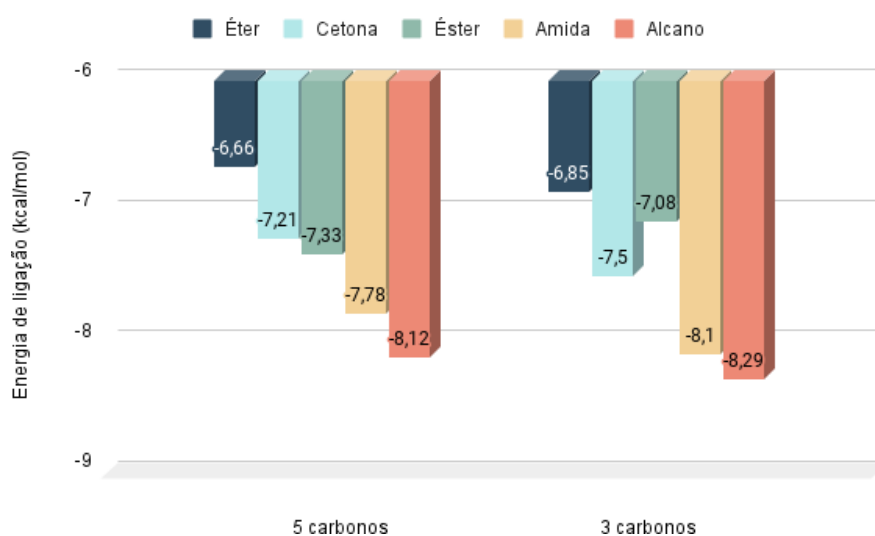


Figura 14. Gráfico em barras dos resultados obtidos das 10 moléculas que seguiram em estudo.

Das estruturas que seguiram no estudo, os resultados mostraram comportamentos semelhantes, mas as estruturas que continham 3 carbonos em seu grupo de ponte, principalmente aquelas com os grupos cetona e amida, tiveram um valor de energia menor, o que permitiu concluir que as inibições realizadas por elas eram melhores. Desta forma, apenas as 5 estruturas que tinham 3 carbonos em seu grupo de ponte foram selecionadas para continuidade do estudo. Em seguida, o docking molecular foi realizado com estas estruturas já otimizadas.

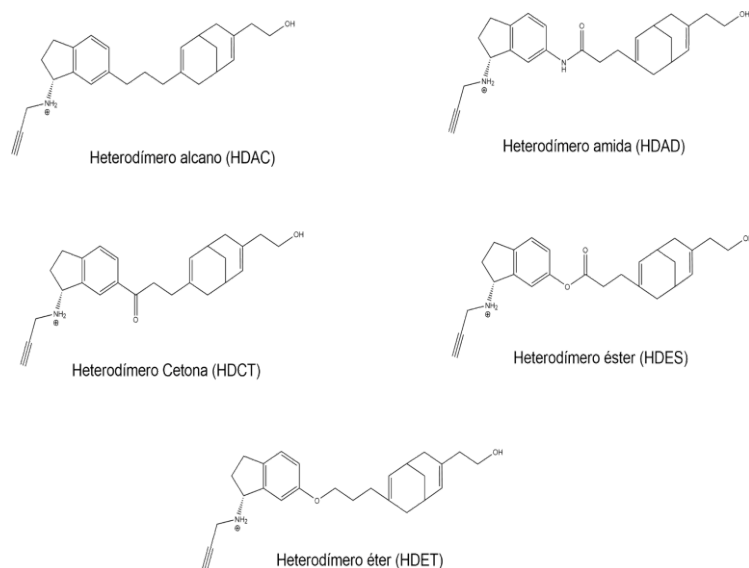


Figura 15. Estrutura química final dos híbridos propostos para estudo.

-HETERODÍMERO ALCANO (HDAC)

O complexo HDAC-*h*AChE se estabiliza com o monômero da HUW direcionado para o fundo do sítio Gorge. Isto implica em uma ligação de hidrogênio de 2,99 Å entre o HE2 do resíduo His447 e o oxigênio da terminação alcoólica da molécula. Interações do tipo pi ocorrem entre os anéis derivados da HUW e resíduos aromáticos como Phe338 e Tyr337. Diferentemente dos outros heterodímeros, este não apresenta um átomo eletronegativo no seu grupo de ponte, não realizando ligações de hidrogênio, assim, o grupo apresenta uma ligação do tipo pi-sigma com o resíduo Tyr341. O seu anel indano também interage com o resíduo Trp286 (ver figura 16). Este complexo foi o que obteve melhor score no docking, com um resultado de -10,58 kcal.mol⁻¹.

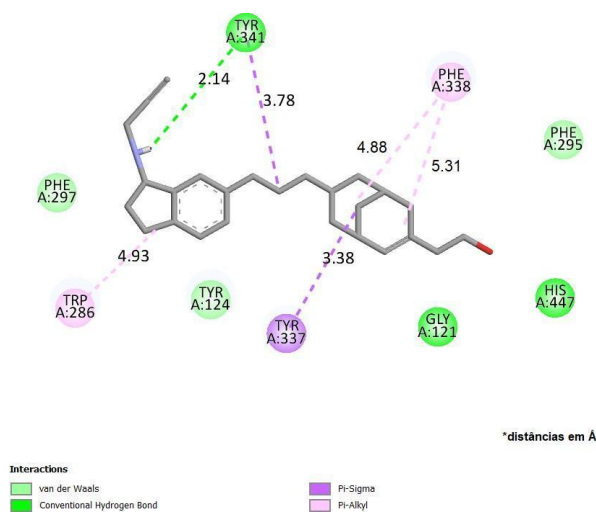


Figura 16. Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDAC.

-HETERODÍMERO AMIDA (HDAD)

O complexo HDAD-*h*AChE obteve um score de energia de ligação de $-10,38 \text{ kcal.mol}^{-1}$. O monômero da HUW interagiu através dos elétrons pi deslocados com os centros dos anéis aromáticos dos os resíduos Trp86, Tyr337 e Phe 338, paralelamente, com o resíduo Asp74, o terminal -OH realizou ligações de hidrogênio. O monômero do LDG comportou-se de forma semelhante. O anel indano apresentou interações do tipo π -alquila com os resíduos Trp286 e Tyr341, com este último, o ligante também fez ligações de hidrogênio. Uma notável ligação de hidrogênio de $3,72 \text{ \AA}$ ocorre entre o nitrogênio da amida do grupo de ponte e o hidrogênio HH do resíduo Tyr124 (ver figura 17).

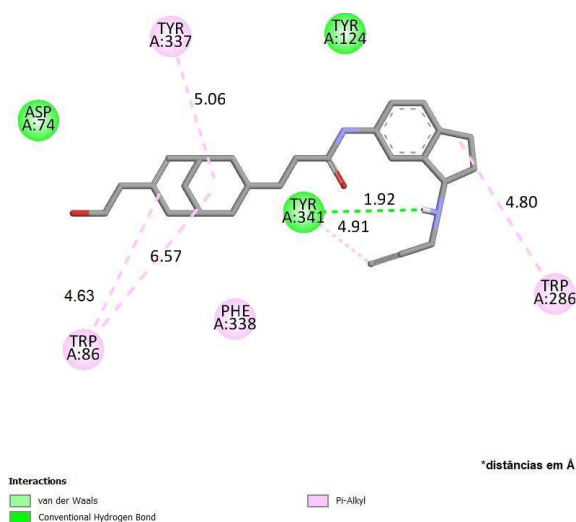


Figura 17. Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDAD.

-HETERODÍMERO CETONA (HDCT)

O HDCT se estabiliza em torno de todo o sítio Gorge, realizando a maioria de suas interações com resíduos do PAS (ver figura 18). O resíduo Tyr341 interage com todas as partes do ligante, indo desde a extremidade do monômero do LDG até os anéis derivados da HUW. Em sua maioria são interações π -alquil, mas sua interação mais forte é uma ligação de hidrogênio de $2,10 \text{ \AA}$. Semelhantemente aos outros ligantes aqui estudados, o anel indano derivado do LDG interage com o Trp286 e o oxigênio da carbonila do ligante faz uma ligação de hidrogênio com o HH do Tyr124 de aproximadamente $3,3 \text{ \AA}$. O resultado final para este docking foi de $-9,49 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

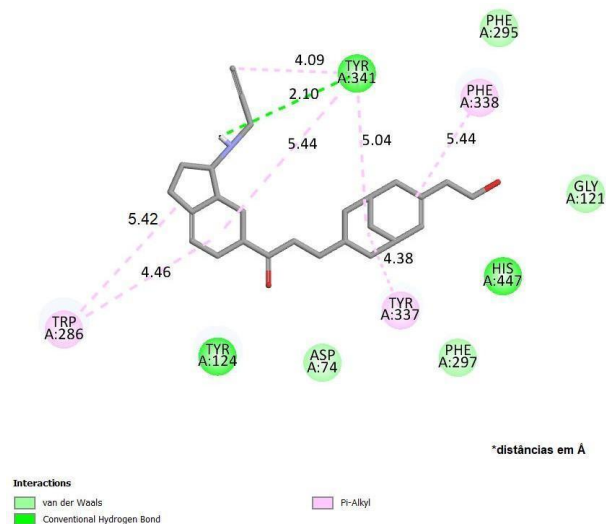


Figura 18. Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDCT.

-HETERODÍMERO ÉSTER (HDES)

Em contrapartida a todos os outros ligantes, o docking com a estrutura otimizada deste ligante não apresentou a conformação que os outros heterodímeros vinham obtendo. Ainda que espalhado por todo o sítio ativo, neste caso, quem se acoplou ao fundo do sítio Gorge foi o monômero do LDG, interagindo majoritariamente com o sítio catalítico e os resíduos dos bolsos de acilação. Esta inversão implicou que desta vez o monômero da HUW interagisse com o Trp286, enquanto o anel indano derivado do LDG interagisse com os resíduos Tyr337 e Phe338 por meio de interações pi-alkil. O único ponto em comum com o comportamento geral, foi a ligação de hidrogênio entre o HH do resíduo Tyr124 e os átomos de oxigênio do grupo éster. A ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila (O60) foi de 2,40 Å e a ligação com outro oxigênio (O62) foi de 2,05 Å. O score final deste docking foi de -5,64 kcal.mol⁻¹.

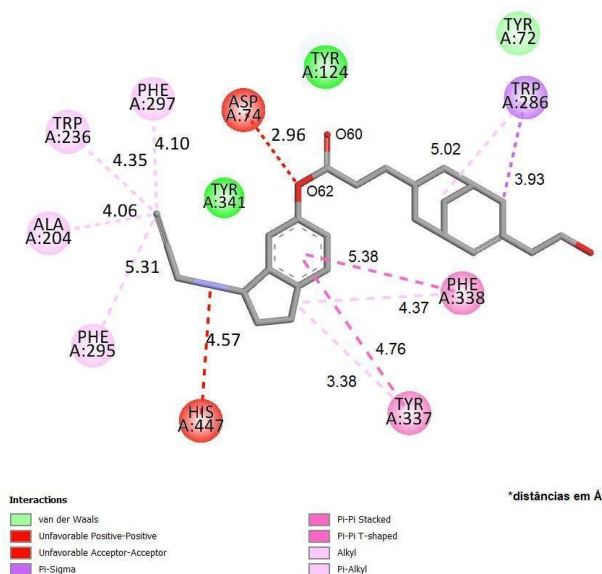


Figura 19. Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDES.

-HETERODÍMERO ÉTER (HDET)

Com o resultado final de energia de interação de $-9,71 \text{ kcal.mol}^{-1}$, o complexo formado entre a proteína e o ligante HDET comportou-se como os demais, com o monômero da HUW orientado ao longo do fundo do sítio ativo, o centro de seus anéis aromáticos interagiu com os resíduos Tyr337, Phe338 e His447. Neste caso, a ligação de hidrogênio mais forte realizada pela radical $-OH$ foi feita com o HG da Ser203 de aproximadamente $2,22 \text{ \AA}$. A esperada ligação de hidrogênio do átomo eletronegativo do grupo de ponte ocorre neste caso com o Asp74 e Tyr124, ambas com cerca de $3,6 \text{ \AA}$. Por fim, o anel indano derivado do LDG interage com os resíduos Trp286 e Tyr341 através de interações pi-pi e ligações de hidrogênio, respectivamente.

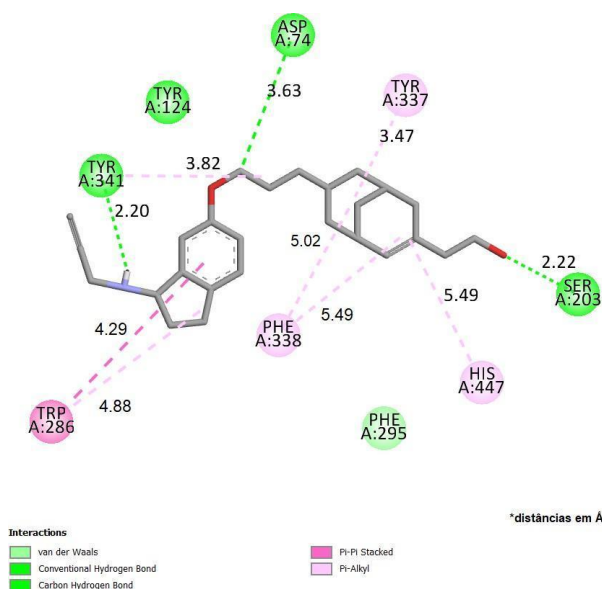


Figura 20. Representação 2D das interações moleculares da estrutura 6O4W e o HDET.

c. ESTRUTURA ELETRÔNICA

Os cálculos de otimização de geometria e estrutura eletrônica realizados forneceram informações sobre os valores e localização dos orbitais de fronteiras das moléculas dos inibidores, bem como o valor e a distribuição das cargas atômicas, distâncias intramoleculares importantes, tanto no vácuo quanto sobre a influência do solvente, usando modelo de solvatação implícito. A Tabela 5 a seguir informa os valores de carga parciais dos hidrogênios mais ácidos usando os métodos DFT com o funcional B3LYP/6-311+G(d,p).

Tabela 5. Valores do gap de energia e carga dos hidrogênios mais ácidos para cálculo de estrutura eletrônica usando DFT.

		GAP (HOMO-LUMO, ELUMO – EHOMO)	H1 (a.u.)	H2 (a.u.)
Vácuo	LDG+	3,69	0,347	0,304
	HUW+	4,00	0,418	0,417
	HDAC+	3,30	0,417	0,292
	HDAD+	3,54	0,419	0,372
	HDCT+	3,42	0,419	0,213
	HDES+	3,10	0,419	0,308
	HDET+	3,42	0,418	0,285
Solvente implícito	LDG+	5,38	0,437	0,299
	HUW+	4,31	0,451	0,457
	HDAC+	5,41	0,498	0,270
	HDAD+	5,26	0,504	0,407
	HDCT+	5,36	0,506	0,258
	HDES+	5,21	0,504	0,292
	HDET+	5,28	0,503	0,289

Dos ligantes propostos, independente do meio solvatado ou não, o HDES é o ligante de menor Gap(HOMO-LUMO) e o que obteve na otimização, uma conformação mais estável. O método se mostrou sensível à alteração do solvente no meio, afetando o valor da diferença de energia, assim como, a presença de um meio solvatado causou a mesma diferença significativa nas cargas dos hidrogênios mais ácidos.

Os valores dos orbitais moleculares nos dizem sobre a reatividade e nos indicam os sítios mais reativos de cada molécula. As imagens (Tabelas 6 e 7) de cada orbital gerado a partir do método DFT seguido de seu valor energético foi analisada.

Tabela 6. Representação gráfica dos orbitais moleculares ocupados e seus respectivos valores usando o método DFT.

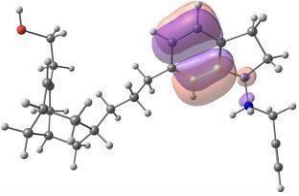
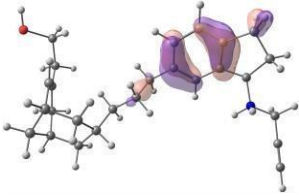
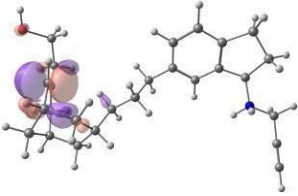
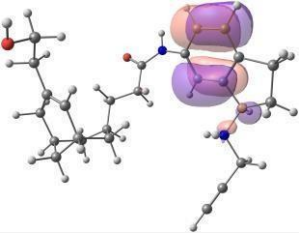
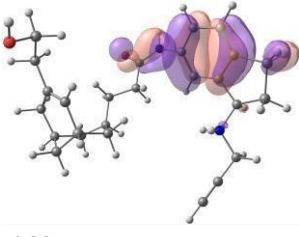
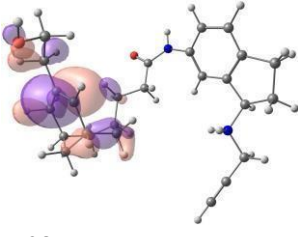
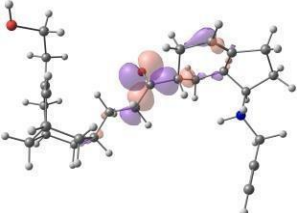
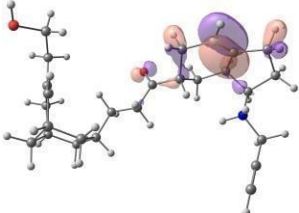
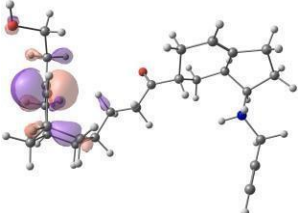
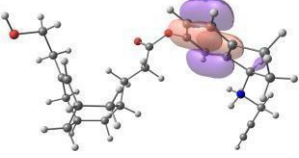
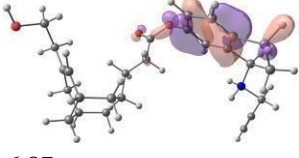
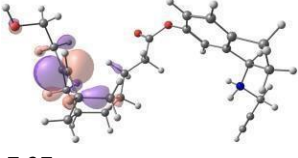
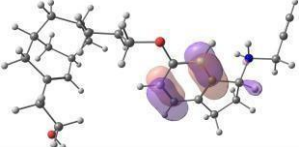
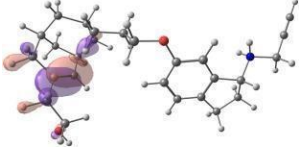
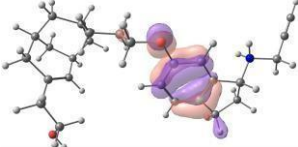
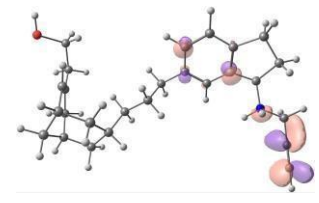
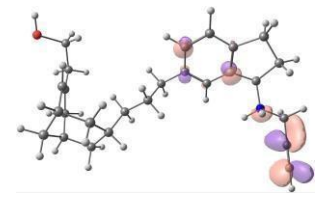
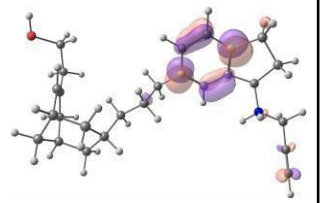
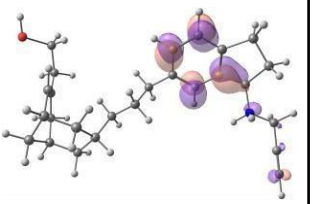
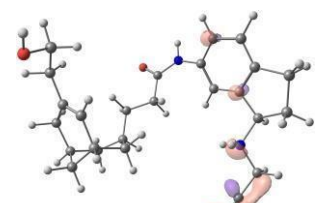
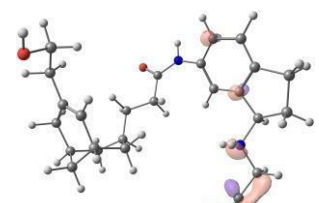
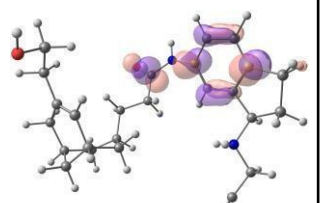
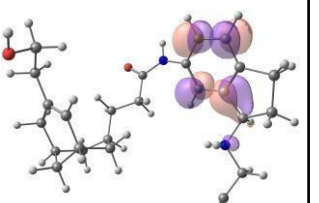
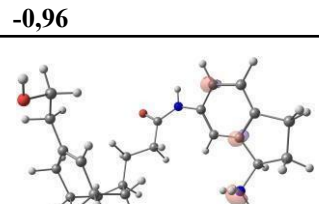
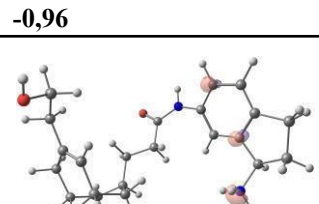
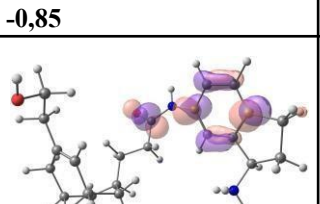
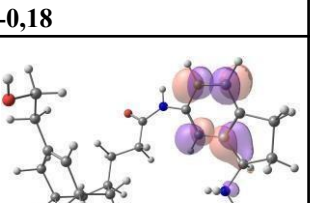
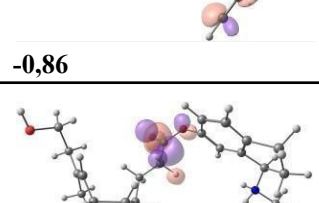
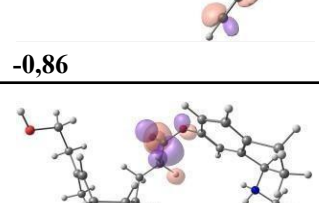
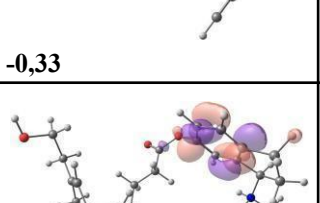
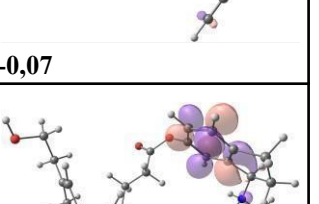
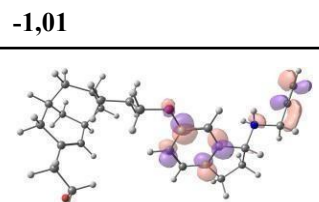
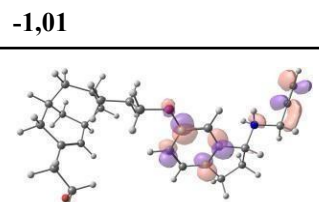
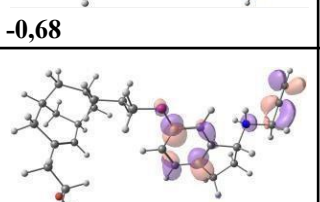
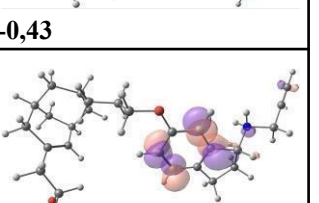
Molécula	FOM	HOMO-2 (eV)	HOMO-1 (eV)	HOMO (eV)
HDAC+		 -6,21	 -6,57	 -7,09
HDAD+		 -6,22	 -6,39	 -7,28
HDCT+		 -6,22	 -6,60	 -7,14
HDES+		 -6,23	 -6,87	 -7,37
HDET+		 -6,15	 -6,22	 -7,18

Tabela 7. Representação gráfica dos orbitais moleculares desocupados e seus respectivos valores usando o método DFT.

Molécula	FOM	LUMO+2 (eV)	LUMO+1 (eV)	LUMO (eV)
HDAC+		 -0,79	 -0,45	 -0,13
HDAD+		 -0,96	 -0,85	 -0,18
HDCT+		 -0,86	 -0,33	 -0,07
HDES+		 -1,01	 -0,68	 -0,43
HDET+		 -0,86	 -0,32	 -0,04

Para o HDAC+, os orbitais HOMO, HOMO-1 e HOMO-2 ficaram distribuídos ao redor das regiões de ligações π do anel aromático por conta da alta densidade eletrônica desta região. Já os orbitais desocupados LUMO, LUMO+1 e LUMO+2 ficaram localizados em regiões parecidas, porém apenas nos anéis derivados do monômero do LDG. Os orbitais a partir do LUMO+1 começaram a ficar distribuídos em torno do nitrogênio e da ligação tripla deste monômero, aparecendo nas regiões que interagiram com o resíduo Tyr341.

Os resultados do HDAD+ para os orbitais ocupados mostraram uma distribuição localizada majoritariamente nos anéis aromáticos de toda a molécula, entretanto, houveram pequenas distribuições em torno dos átomos eletronegativos. No HOMO-2, parte do orbital ficou localizado no grupo funcional amida da ponte. Todos os orbitais LUMO, LUMO+1 e LUMO+2 ficaram exclusivamente no monômero do LDG e no grupo amida.

Para o HDCT+, os resultados foram semelhantes aos HDAD+. A diferença está apenas nos orbitais HOMO-1 e HOMO-2, que ficaram mais distribuídos em torno do grupo cetona. O orbital LUMO ficou localizado principalmente em torno do carbono da carbonila do grupo cetona. Enquanto que, o LUMO+1 e LUMO+2 se distribuíram pelo monômero do LDG, principalmente no seu nitrogênio, ou seja, nas partes da molécula que interagiram com os resíduos Asp74, Tyr124 e Tyr341.

A molécula de HDES+ novamente apresentou um comportamento levemente diferente dos demais ligantes. Neste caso, o orbital HOMO ficou localizado exclusivamente no monômero da HUW. Os orbitais seguintes HOMO-1 e HOMO-2 por sua vez, ficaram exclusivamente no monômero do LDG, curiosamente, na mesma região do anel indano que os orbitais LUMO e LUMO+1 se distribuíram. De todos os ligantes, estes orbitais foram os com maior efeito de contaminação por spin. Apenas no LUMO+2 que a distribuição eletrônica se deslocou para o grupo éster no grupo de ponte.

Para o HDET+, os primeiros orbitais de fronteira LUMO e HOMO ficaram localizados na mesma região, sobre o anel indano derivado do LDG. Já o orbital HOMO-1 se localizou sobre as regiões do monômero da HUW que interagem com os resíduos da tríade catalítica, Ser203 e His447. Os orbitais desocupados ficaram distribuídos exclusivamente nos anéis derivados do LDG e no grupo de ponte.

d. ÍNDICES DE REATIVIDADE DE FUKUI

A partir do valor gap entre os orbitais LUMO e HOMO, propriedades como potencial químico, eletronegatividade, dureza, entre outras, podem ser estudadas, para melhor compreensão da estabilidade da molécula via densidade eletrônica (Tabela 8).

Tabela 8. Índices de reatividade de Fukui dos ligantes propostos.

Ligante	μ	χ	ω	η	S
HDAC+	-3,59	3,59	2,45	2,63	0,38
HDAD+	-3,54	3,54	2,34	2,68	0,37
HDCT+	-3,63	3,63	2,52	2,61	0,38
HDES+	-3,51	3,51	2,33	2,64	0,38
HDET+	-3,50	3,50	2,26	2,71	0,37

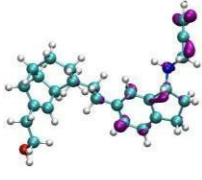
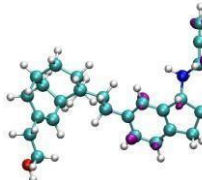
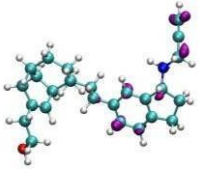
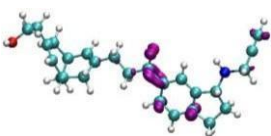
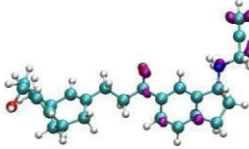
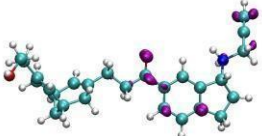
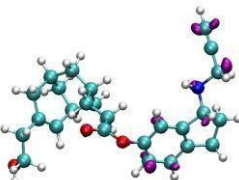
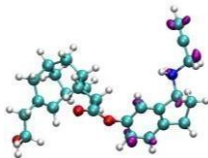
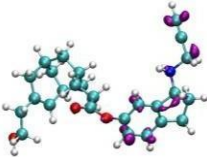
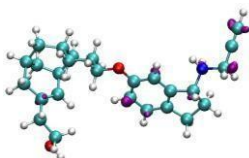
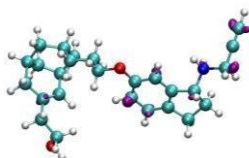
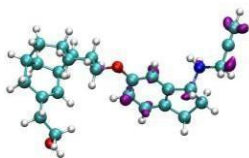
Legenda: μ = potencial químico (eV); χ = eletronegatividade (eV); ω = eletrofilicidade (eV); η = dureza global (eV); S = maciez global (eV⁻¹)

Seguindo a ideia atômica, a eletronegatividade da molécula informa sobre o quão aquele sistema é aceptor de elétrons e, portanto, é um sistema muito reativo. Dos ligantes aqui testados, os mais reativos foram HDCT+, HDAC+ e HDAD+, o que coincide diretamente com os resultados de docking onde os melhores resultados estavam associados a estes ligantes.

Paralelamente, baixos valores de dureza indicam menores reatividades no sistema, enquanto a maciez global, indica o inverso. Neste caso, os sistemas menos duros são aqueles que mostraram maior reatividade anteriormente, e por fim, a maciez e a dureza classificam por definitivo que estes ligantes são os menos estáveis dos propostos neste trabalho.

A Tabela 9 mostra as regiões da molécula onde se encontram os sítios mais eletrofílicos e nucleofílicos destas moléculas. Intituladas como f⁻, f⁺ e f₀, estas regiões medem o quão o sistema está suscetível a sofrer ataque nucleofílico ou ataque eletrofílico.

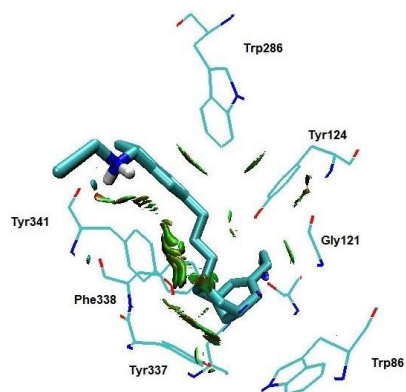
Tabela 9. Representação das regiões indicadas pelas funções de Fukui.

Molécula	FOM	f-	f+	f0
HDAC+				
HDCT+				
HDES+				
HDET+				

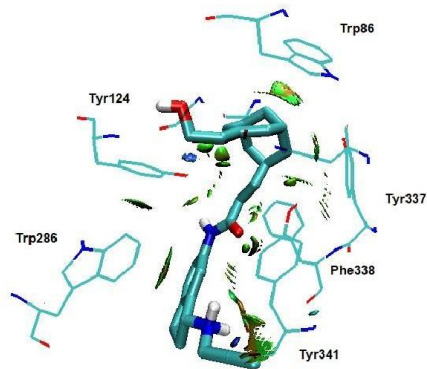
Curiosamente, para os ligantes aqui testados, todas estas funções descrevem a mesma região e os mesmos átomos. Estes átomos são, principalmente, aqueles derivados do monômero do LDG. Quando comparadas às distribuições dos orbitais de fronteira, observamos que é nesta região que todos os orbitais LUMO, LUMO+1 e LUMO+2 estão localizados. Em contrapartida, alguns orbitais HOMO e HOMO-1, encontram-se distribuídos também nos anéis derivados da HUW, porém, todos os orbitais HOMO-2 se localizam nas regiões indicadas pelos índices de Fukui.

e. INTERAÇÕES NÃO-COVALENTES (NCI)

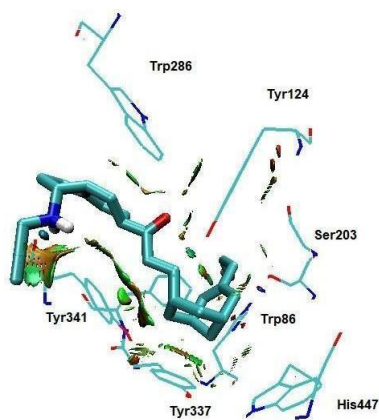
A partir das estruturas ligante-proteína formadas nos estudos de docking, uma outra forma de avaliar as interações ocorrentes nestes complexos é através da densidade eletrônica e das coordenadas de cada átomo daquele sistema. As imagens a seguir foram obtidas com os resultados da análise das NCI realizadas pelo software Multiwfn.



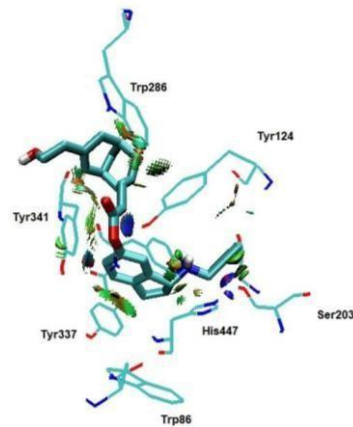
a)



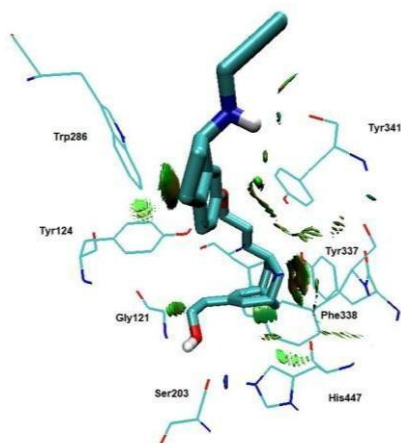
b)



c)



d)



e)

Figura 21. Representação das regiões de interações não-covalentes (NCI). **a)** Complexo *hAChE*-HDAC⁺; **b)** Complexo *hAChE*-HDAD⁺; **c)** Complexo *hAChE*-HDCT⁺; **d)** Complexo *hAChE*-HDES⁺; **e)** Complexo *hAChE*-HDET⁺;

O estudo NCI dos complexos mostraram um comportamento comum a quase todos os ligantes. No geral, a maior parte das interações ocorrem como interações de van der Waals entre os anéis dos ligantes e os resíduos aromáticos do PAS, principalmente Trp286, Tyr337, Phe338 e Tyr341. Como observado nos estudos de *docking*, por exceção do HDES⁺, os ligantes entraram no sítio Gorge com os anéis derivados da HUW orientados para o fundo do sítio, em todas as imagens podemos observar áreas de superfície verde, que indicam interações de van der Waals. Nos complexos com os ligantes HDAC⁺, HDAD⁺ e HDCT⁺, áreas com uma superfície que indicam ligações de hidrogênio podem ser observadas entre a amina protonada do ligante e o resíduo Tyr341.

O ligante HDES⁺ (ver Figura 21.d), orientado diferentemente dos outros, interage de forma mais forte com o resíduo Tyr124 em uma bem definida ligação de hidrogênio representada por uma área de superfície azul. O ligante também apresentou ligações de hidrogênio entre a parte derivada do monômero do LDG e os resíduos da tríade catalítica Ser203 e His447.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho baseados em *drug design* e cálculos computacionais de estrutura eletrônica, foram usados para a avaliação de uma nova série de moléculas com perfil para um potencial fármaco. A partir de técnicas de heterodimerização e bioisosterismo, trinta novas estruturas moleculares, híbridas de moléculas extensamente estudadas foram desenhadas. Na primeira avaliação, apenas doze dessas moléculas estavam menos polarizadas e eram capazes de penetrar a barreira hematoencefálica. Assim, dada a enzima aqui estudada, apenas estas poderiam seguir neste estudo.

A partir dos estudos preliminares de *docking*, foi observado nas moléculas em que o grupo de ponte conectava os dois monômeros através de três carbonos, o resultado era consideravelmente melhor. Assim, foi possível determinar as cinco moléculas desejadas para estudo das propriedades farmacológicas e potencial inibitório. Os cinco ligantes eram bioisósteros que variam em função orgânica presente no grupo de ponte. Os resultados de estrutura eletrônica revelaram a partir dos valores dos orbitais de fronteira e seu gap, que o ligante mais instável era o HDES+ e que majoritariamente os orbitais LUMO se distribuíram em torno do monômero do LDG, enquanto os orbitais HOMO ficaram localizados por toda a molécula.

O estudo de *docking* feito com os ligantes usando as suas geometrias otimizadas, os novos complexos formados apresentaram um resultado de interação semelhante, uma vez que a maioria encontrou uma conformação parecida com o sítio ativo. Com exceção do HDES+, os ligantes se complexam com o monômero da HUW orientado ao sítio CAS do Gorge, enquanto o monômero do LDG se encontra na outra extremidade, o que mimetiza os ligantes de partida. O estudo 2D das interações do ligante indicam interações π com os resíduos Trp286, Tyr337 e Phe338 e ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr124 e Tyr341. Estes resultados entram em concordância com aqueles obtidos através da análise promolecular das interações não covalentes. Os índices de reatividade de Fukui foram responsáveis por definirmos os sistemas mais reativos. Segundo os índices, as moléculas mais reativas são HDAC+, HDAD+ e HDCT+.

Por fim, a análise das funções de Fukui, indicaram que as regiões suscetíveis a um ataque de qualquer natureza eram exatamente as regiões onde a maioria dos orbitais estavam distribuídos. Todos estes valores permitem concluir que as moléculas que se mostram melhor potencial como inibidores da *hAChE* foram HDAC+ > HDAD+ > HDCT+. Considerando o desenvolvimento de novos fármacos, estas moléculas são as melhores candidatas para o desenvolvimento de estudos pré-clínico.

REFERÊNCIAS

1. What is Alzheimer's Disease? Alzheimer's Association. Chicago, Illinois. 2023. Disponível em: <<https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers>>. Acesso em 04 fev 2023.
2. Dementia. World Health Organization. Genebra. 20 de setembro de 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em 04 fev 2023.
3. 2022 Alzheimer's Disease Facts and Figures: More Than Normal Aging: Understanding Mild Cognitive Impairment. Alzheimer's Association. Chicago, Illinois. 2022
4. PLANCHE, V.; MANJON, J. V.; MANSENCAL, B.; LANUZA, E.; TOURDIAS, T.; CATHELIN, G.; COUPE, P. Structural progression of Alzheimer's disease over decades: The MRI staging scheme. *Brain Communications*, 4(3), 2022.
5. DETURE, M. A.; DICKSON, D. W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. In *Molecular Neurodegeneration* 1ª ed. Vol.14. BioMed Central Ltd, 2019.
6. HYMAN, B. T. et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 8(1), 1–13, 2012
7. GUSTAVSSON, A. et al. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's and Dementia*, 2022
8. MUCKE, L. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature*, 461(7266), 895–897. 2009
9. MANTZAVINOS, V., ALEXIOU, A. Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Current Alzheimer Research*, 14(11), 1149–1154, 2017
10. HANSEEUW, B. J., et al. Association of Amyloid and Tau with Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurology*, 76(8), 915–924, 2019.
11. SHARRE, D. W. Preclinical, Prodromal, and Dementia Stages of Alzheimer's Disease. *Practical Neurology*, 2019.
12. TERRY, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 3ª edição, Vol. 306, p. 821–827, 2003.
13. CONTESTABILE, A. The history of the cholinergic hypothesis. In *Behavioural Brain Research*. 2ªed, Vol. 221, p. 334–340, 2011.
14. ALCOLEA-PALAFIX, M., et al. Research strategies developed for the treatment of Alzheimer's disease. Reversible and pseudo-irreversible inhibitors of acetylcholinesterase: Structure-activity relationships and drug design. In *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*, p. 426–477. Elsevier Inc, 2014.
15. STEDMAN, E., STEDMAN, E., EASSON, L. H. (n.d.). *ccxlv. Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse, 1932.*

16. DELFINO, R. T., RIBEIRO, T. S., FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. In *J. Braz. Chem. Soc.* 3^a ed., 2009.
17. SUSSMAN, J. HAREL, M. , FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L., SILMAN, I. Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science*, 253(5022)(872–879, 1991.
18. DVIR, H., SILMAN, I., HAREL, M., ROSENBERRY, T. L., SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1–3), 10–22, 2010.
19. ROTUNDO, R. L. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology*, 32(5–8), 743–766, 2003.
20. POLINSKY, R. J. Clinical pharmacology of rivastigmine: A new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer’s disease. *Clinical Therapeutics*, 20(4), 634–647, 1998.
21. GERLITS, O., HO, K., CHENG, X., BLUMENTHAL, D., TAYLOR, P., KOVALEVSKY, A., RADIĆ, Z.. Chemico-Biological Interactions A new crystal form of human acetylcholinesterase for exploratory room- temperature crystallography studies. *Chemico-Biological Interactions*, 309(March), 108698, 2019.
22. NASCIMENTO, É. C. M., OLIVA, M., ŚWIDEREK, K., MARTINS, J. B. L., ANDRÉS, J. BINDING Analysis of Some Classical Acetylcholinesterase Inhibitors: Insights for a Rational Design Using Free Energy Perturbation Method Calculations with QM/MM MD Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(4), 958–976, 2017.
23. NELSON, D. L.; COX, Michael M.. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 7 Porto Alegre: Artmed, 2019, 1278 p
24. ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home>>. Acesso em: 04 fev 2023.
25. FDA. United States’ Food and Drug Administration. Disponível em: <<https://www.fda.gov/>>. Acesso em 04 fev 2023.
26. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Donepezil, Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3152>> Acesso em: 14 jul 2023
27. CHEUNG, J., RUDOLPH, M. J., BURSHTEYN, F., CASSIDY, M. S., GARY, E. N., LOVE, J., FRANKLIN, M. C., HEIGHT, J. J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(22), 10282–10286, 2012.
28. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Galantamine, Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9651>> Acesso em: 14 jul 2023
29. GREENBLATT, H. M., KRYGER, G., LEWIS, T., SILMAN, I., SUSSMAN, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Letters*, 463(3), 321–326, 1999.

30. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Rivastigmine, Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77991>> Acesso em: 14 jul 2023
31. BAR-ON, P., MILLARD, C. B., HAREL, M., DVIR, H., ENZ, A., SUSSMAN, J. L., SILMAN, I. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry*, 41(11), 3555–3564, 2002.
32. WEINREB, O., BAR-AM, O., AMIT, T., DRIGUES, N., SAGI, Y., YODIM, M. B. H. The neuroprotective effect of ladostigil against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 175(1–3), 2008.
33. BAR-AM, O., WEINREB, O., AMIT, T., YODIM, M. B. H. The novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor and antioxidant, ladostigil, confers neuroprotection in neuroblastoma cells and aged rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 37(2), 135–145, 2009.
34. EVA MEZEIOVA *ET AL* 2020 *Russ. Chem. Rev.* **89** 999
35. RONCO, C., JEAN, L., RENARD, P. Y. Improved synthetic pathway for the derivatization of huprine scaffold. *Tetrahedron*, 66(37), 7399–7404, 2010.
36. NACHON, F., CARLETTI, E., RONCO, C., TROVASLET, M., NICOLET, Y., JEAN, L., RENARD, P. Y. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: Elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal*, 453(3), 393–399, 2013.
37. BOLOGNESI, M. L., CAVALLI, A., MELCHIORRE, C. MEMOQUIN: A Multi-Target-Directed Ligand as an Innovative Therapeutic Opportunity for Alzheimer's Disease. Vol. 6, 152–162, 2009.
38. LIMA, L.; BARREIRO, E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, 12(1), 23–49, 2012.
39. RYDBERG, E. H., et al. Complexes of Alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(18), 5491–5500, 2006.
40. MEZEIOVA, E. et al. Huprine Y – Tryptophan heterodimers with potential implication to Alzheimer's disease treatment. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 43, 2021.
41. ZAMBRANO, P., SUWALSKY, M., JEMIOLA-RZEMINSKA, M., GALLARDO-NELSON, M. J., STRZALKA, K., MUÑOZ-TORRERO, D. Protective role of a donepezil-huprine hybrid against the β -amyloid (1-42) effect on human erythrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 2021.
42. DOYTCHINOVA, I. . Drug Design—Past, Present, Future. In *Molecules* Vol. 27. MDPI, 2022.
43. MANDAL, S., MOUDGIL, M., MANDAL, S. K. Rational drug design. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 625, Issues 1–3, pp. 90–100, 2009.
44. PRATHIPATI, P., DIXIT, A., SAXENA, A. K. Computer-Aided Drug Design: Integration of Structure-Based and Ligand-Based Approaches in Drug Design. In *Current Computer-Aided Drug Design* (Vol. 3), 2005.

45. DAINA, A., MICHELIN, O., ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7, 2007.
46. DONG, J. et al. Admetlab: A platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *Journal of Cheminformatics*, 10(1), 2018.
47. GSCHWEND, D. A., GOOD, A. C., KUNTZ, I. D. Molecular Docking Towards Drug Discovery. *Journal Of Molecular Recognition* , Vol. 9, 1996.
48. DIAS, R., FILGUEIRA DE AZEVEDO, W. Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets* Vol. 9, 2008.
49. PARR, R. G. Density Functional Theory, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 1983.
50. ORIO, M., PANTAZIS, D. A., NEESE, F. Density functional theory. *Photosynthesis Research* Vol. 102, p. 443–453, 2009.
51. COUSINS, KIMBERLEY R. ChemDraw Ultra 9.0. CambridgeSoft, 100 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140. www.cambridgesoft.com. See Web site for pricing options.. *Journal of the American Chemical Society*, 127(11), 4115–4116, 2005.
52. Gaussian 16, Revision, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A. V.; BLOINO, J.; JANESKO, B. G.; GOMPERS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCHIAN, H. P.; ORTIZ, J. V.; IZMAYLOV, A. F.; SONNENBERG, J. L.; WILLIAMS-YOUNG, D.; DING, F.; LIPPARINI, F.; EGIDI, F.; GOINGS, J.; PENG, B.; PETRONE, A.; HENDERSON, T.; RANASINGHE, D.; ZAKRZEWSKI, V. G.; GAO, J.; REGA, N.; ZHENG, G.; LIANG, W.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; THROSELL, K.; MONTGOMERY, J. A., JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M. J.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E. N.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KEITH, T. A.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A. P.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; ADAMO, C.; CAMMI, R.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; FOX, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
53. MICHEL F. SANNER. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graphics Mod.*, 1999, Vol 17, February. p57-61
54. MORRIS, G., et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2009.
55. Tian Lu, Feiwu Chen, *J. Comput. Chem.*, 33, 580-592, 2012.
56. DING, K., YIN, S., LI, Z., JIANG, S., YANG, Y., ZHOU, W., Huang, B. Observing non-covalent interactions in experimental electron density for macromolecular systems: A novel perspective for 2 protein-ligand interaction research, 2022.