

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

Antonia Duarte Silveira Grassi Silveira

**TRIAGEM VIRTUAL DE COMPOSTOS ANÁLOGOS A FÁRMACOS  
INIBIDORES DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA COMO  
POSSÍVEIS ANTICOLINESTERÁSICOS**

Santa Maria, RS  
2023

Antonia Duarte Silveira Grassi Silveira

**TRIAGEM VIRTUAL DE COMPOSTOS ANÁLOGOS A FÁRMACOS INIBIDORES  
DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA COMO POSSÍVEIS  
ANTICOLINESTERÁSICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Bacharelado, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Bacharel em Química**.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

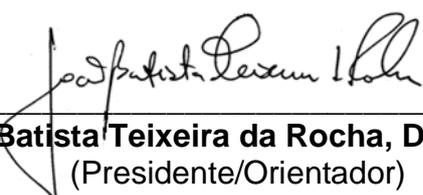
Santa Maria, RS  
2023

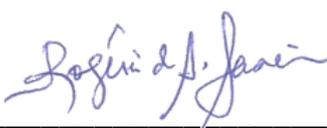
**Antonia Duarte Silveira Grassi Silveira**

**TRIAGEM VIRTUAL DE COMPOSTOS ANÁLOGOS A FÁRMACOS INIBIDORES  
DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA COMO POSSÍVEIS  
ANTICOLINESTERÁSICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Química  
Bacharelado, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
**Bacharel em Química.**

Aprovado em 13 de fevereiro de 2023.

  
**João Batista Teixeira da Rocha, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
**Rogério de Aquino Saraiva, Dr. (UFCA)**

Santa Maria, RS  
2023

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente **a Deus e à minha família** pela força e o apoio ao longo dos anos. **Lucas**, minha segunda família, meu parceiro de todas as horas, eu não teria conseguido sem ti. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditei.

**Ao meu orientador**, por ter aceitado a minha ideia e me dado liberdade na construção e desenvolvimento da mesma. Aos professores **Dr. Ademir Farias Morel e Dra. Ionara Irion Dalcol**, química orgânica fica muito mais fácil de ser compreendida quando ensinada por vocês. Agradeço de coração por terem se colocado à disposição de sanar minhas dúvidas e terem contribuído para a conclusão deste trabalho.

**Pablo**, você foi incrível comigo. Sempre muito paciente, tranquilo e disponível quando precisei. Me auxiliou desde o princípio, me ensinou tudo que eu precisava saber e mais ainda, fez eu me apaixonar pela bioquímica além do que eu acreditava ser possível.

**Aos meus amigos, Emily, Gabriela, Carolina, Gabrielle, Felipe, Maurício, Ana Carolina**, que quando eu me sentia para baixo, sobrecarregada e sem saída, tinham uma palavra de consolo, um ouvido atento e conselhos preciosos. **Amo vocês!**

## RESUMO

### TRIAGEM VIRTUAL DE COMPOSTOS ANÁLOGOS A FÁRMACOS INIBIDORES DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA COMO POSSÍVEIS ANTICOLINESTERÁSICOS

AUTORA: Antonia Duarte Silveira Grassi Silveira

ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

Clinicamente, a Doença de Alzheimer (DA) está associada a sintomas funcionais e comportamentais, além de diversos sintomas cognitivos, que podem ser explicados pelo déficit de neurotransmissão colinérgica. A galantamina, um composto inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), tem sido amplamente utilizada como principal tratamento contra a DA. Evidências clínicas e estudos de imagens sugerem que pacientes tratados com o inibidor anticolinesterásico galantamina em conjunto com antidepressivos da classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs) podem ter benefícios adicionais. O Transtorno Depressivo Maior (TDM) atualmente afeta mais de 350 milhões de pessoas globalmente. Medicamentos mais recentes para tratamento deste transtorno foram aprovados para uso no final da década de 2000, dentre os quais estão os ISRSs. Considerando o possível uso de ISRSs como anticolinesterásicos, o presente estudo tem como objetivo avaliar o caráter inibitório de moléculas de origem natural, com estruturas químicas análogas aos antidepressivos fluoxetina, sertralina, escitalopram e vortioxetina, frente à enzima AChE. Foi realizada uma triagem virtual baseada nas subestruturas dos antidepressivos mencionados, nos bancos de dados *PubChem*, *Natural Products Atlas* e *Drug Bank*. Os compostos que se adequaram à Regra dos Cinco de *Lipinski*, não apresentaram toxicidade e demonstraram um valor de  $DL_{50}$  satisfatório passaram pelo protocolo de *docking molecular*. Os dados obtidos revelaram a presença de quatro possíveis inibidores: (2'S,11bR)-variecolortin B, (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E, (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B e (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B. Todas as interações intermoleculares avaliadas ocorreram entre os compostos e resíduos, tais como Trp-286, Phe-297 e Ser-293, já comprovados na literatura como presentes no sítio ativo da enzima AChE. No entanto, apresentaram uma afinidade de ligação ao sítio da enzima levemente inferior à do inibidor de referência. Todos os compostos exibiram propriedades físico-químicas favoráveis à biodisponibilidade oral. Estes são potenciais agentes para o planejamento e desenvolvimento de novos medicamentos e/ou tratamentos para DA. Por se tratar de um estudo *in silico*, aconselha-se sua avaliação em testes *in vitro* e, posteriormente, *in vivo*, para determinar sua real eficácia.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer. Acetilcolinesterase. Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina. Triagem Virtual. *Docking Molecular*.

## ABSTRACT

### VIRTUAL SCREENING INHIBITOR DRUG-ANALOGOUS COMPOUNDS OF SEROTONIN REUPTAKE AS POSSIBLE ANTICOLINESTERASICS AGENTS

AUTHOR: Antonia Duarte Silveira Grassi Silveira  
ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

Clinically, Alzheimer's disease (AD) is associated with functional and behavioral symptoms, in addition to several cognitive symptoms, which can be explained by the cholinergic neurotransmission deficit. Galantamine, an acetylcholinesterase (AChE) inhibitor compound, has been widely used as the main treatment for AD. Clinical evidence and imaging studies suggest that patients treated with the anticholinesterase inhibitor galantamine in conjunction with antidepressants in the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) class may experience additional benefit. Major Depressive Disorder (MDD) currently affects over 350 million people globally. Newer drugs for treating this disorder were approved for use in the late 2000s, among which are the SSRIs. Considering the possible use of SSRIs as anticholinesterases, the present study aims to evaluate the inhibitory character of molecules of natural origin, with chemical structures similar to those from the antidepressants fluoxetine, sertraline, escitalopram and vortioxetine, against the AChE enzyme. A virtual screening was performed based on the substructures of the mentioned antidepressants, in the PubChem, Natural Products Atlas and Drug Bank databases. The compounds that complied with Lipinski's Rule of Five, showed no toxicity and demonstrated a satisfactory LD<sub>50</sub> value, underwent the molecular docking protocol. The data obtained revealed the presence of four possible inhibitors: (2'S,11bR)-variecolortin B, (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E, (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B and (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B. All intermolecular interactions evaluated occurred between compounds and residues, such as Trp-286, Phe-297 and Ser-293, already proven in the literature as present in the active site of the AChE enzyme. However, they showed a slightly lower binding affinity to the enzyme site than the reference inhibitor. All compounds exhibited physicochemical properties favorable to oral bioavailability. These are potential agents for planning and developing new drugs and/or treatments for AD. As this is an *in silico* study, it is advisable to evaluate it in *in vitro* tests and, subsequently, *in vivo*, to determine its real effectiveness.

**Keywords:** Alzheimer's disease. Acetylcholinesterase. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. Virtual Screening. Molecular Docking.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Mudanças bioquímicas e estruturais que ocorrem no cérebro devido à DA.....	13
FIGURA 2 - Mecanismo de reação para hidrólise de ACh (acilação) catalisada pela AchE e mecanismo de desacilação da enzima.....	14
FIGURA 3 - Representação sítio ativo AChE humana.....	15
FIGURA 4 - Representação do mecanismo de ação dos ISRSs.....	17
FIGURA 5 - Estruturas dos antidepressivos fluoxetina, sertralina, escitalopram e vortioxetina.....	19
FIGURA 6 - Subestruturas relativas aos antidepressivos utilizados como base para o estudo.....	24
FIGURA 7 - Compostos análogos à subestrutura do escitalopram.....	26
FIGURA 8 - Compostos análogos à subestrutura da sertralina.....	27
FIGURA 9 - Compostos análogos à subestrutura da vortioxetina.....	29
FIGURA 10 - Interações das moléculas selecionadas com o sítio ativo da enzima AChE.....	33
FIGURA 11 - Interação do controle galantamina com o sítio ativo da enzima AChE.....	34

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Valores para Regra dos Cinco de Lipinski, solubilidade, DL50 e toxicidade para compostos análogos à subestrutura do escitalopram.....	26
QUADRO 2 – Valores para Regra dos Cinco de Lipinski, solubilidade, DL50 e toxicidade para compostos análogos à subestrutura da sertralina.....	28
QUADRO 3 – Valores para Regra dos Cinco de Lipinski, solubilidade, DL50 e toxicidade para compostos análogos à subestrutura da vortioxetina..	29
QUADRO 4 – Interações ligante-proteína e distâncias de ligação.....	32
QUADRO 5 – Interações controle-proteína e distâncias de ligação.....	35
QUADRO 6 – Propriedades físico-químicas dos compostos (2'S, 11bR)-variecolortin B, (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B, (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E e (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B de acordo com a Regra dos Cinco de Lipinski.....	37

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1	DOENÇA DE ALZHEIMER E A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	12
1.2	INIBIDORES DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA.....	16
1.3	RELAÇÃO ENTRE ISRSs E A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	19
1.4	VANTAGENS NO USO DE MOLÉCULAS DE ORIGEM NATURAL.....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	24
3.1	DETERMINAÇÃO DAS SUBESTRUTURAS.....	24
3.2	PROTOCOLO DE DOCKING MOLECULAR.....	31
3.3	ANÁLISE DE INTERAÇÕES POR DOCKING MOLECULAR.....	31
3.4	ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS NATURAIS.....	35
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

Alois Alzheimer publicou, no ano de 1907, o relato de caso de uma paciente de 51 anos que sofria de demência progressiva. Dentre os sintomas observados, podemos citar perda de memória, confusão mental e paranoia como as principais consequências da doença. A autópsia mostrou um cérebro com células nervosas anormais, contendo um emaranhado de fibras espessas e aglomerados de terminações nervosas em degeneração (ALZHEIMER, 1907). Essa doença afeta até 5% dos idosos acima de 65 anos, aumentando para 20% a incidência de casos naqueles acima de 80 anos (FRATIGLIONI; DE RONCHI; AGÜERO-TORRES, 1999).

Clinicamente, a Doença de Alzheimer (DA) está associada a sintomas funcionais e comportamentais, além de diversos sintomas cognitivos, que podem ser explicados pelo déficit de neurotransmissão colinérgica devido à perda de neurônios colinérgicos (BARTUS et al., 1982; CUMMINGS; BACK, 1998). A principal abordagem de tratamento aprovada pelos órgãos competentes concentra-se na terapia de reposição para déficits na neurotransmissão colinérgica central, com resultados satisfatórios com uso de anticolinesterásicos reversíveis para amplificar a ação fisiológica do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em pacientes com a doença (MARTINEZ; CASTRO, 2006; LAHIRI et al., 2002).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é conhecida por sua alta eficiência, sendo capaz de catalisar a quebra de até 10.000 moléculas de ACh por segundo (PROTEIN DATA BANK IN EUROPE, [2022]). A AChE é alvo de diversos inseticidas, agentes nervosos e drogas terapêuticas, em particular a primeira geração de medicamentos anti-Alzheimer (SILMAN; SUSSMAN, 2005). Um efeito inibitório sobre a atividade da AChE aumenta a concentração de ACh na fenda sináptica com super ativação da transmissão colinérgica (ENZ et al., 1993). Tanto a síntese guiada por alvo quanto o design de drogas baseado em estrutura têm sido usados de maneira eficaz para obter agentes anticolinesterásicos eficazes (SILMAN; SUSSMAN, 2005).

Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma condição psiquiátrica grave e na grande maioria das vezes, debilitante, ocasionando graves consequências sociais, com implicações econômicas e na área da saúde. Inicialmente, eram utilizados antidepressivos tricíclicos e aqueles com capacidade inibitória da enzima monoamina oxidase (MAOIs) como tratamento para a doença (SANCHEZ; REINES; MONTGOMERY, 2014). No entanto, em um contexto geral, as novas classes de

antidepressivos, inclusos os chamados Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRSs), são mais bem toleradas que antidepressivos tricíclicos e MAOIs devido à diminuição dos efeitos colaterais resultantes do seu uso (GILLMAN, 2007). Existem no mercado hoje em dia seis principais antidepressivos ISRSs: fluoxetina, citalopram, escitalopram, paroxetina, sertralina e fluvoxamina. Estes formam um grupo de moléculas estruturalmente não-correlacionadas que compartilham de um mecanismo de ação semelhante (EDINOFF et al., 2021).

Medicamentos produzidos a partir de fontes sintéticas - com auxílio de pesquisas assistidas por computador, como a química computacional e uso de medicações já aprovadas, buscando alterar sua estrutura ou combiná-la com outra molécula - exercem menos efeitos terapêuticos com mais efeitos colaterais diversos (VALECHA et al., 2010). Dito isso, agentes terapêuticos provindos de fontes naturais podem diminuir significativamente ou até mesmo evitar efeitos colaterais indesejados, pois produzem efeitos fisiológicos e farmacológicos já em células vivas. Não obstante, são capazes de uma maior interação com proteínas, enzimas e demais moléculas e estruturas presentes no meio biológico (LAHLOU, 2013).

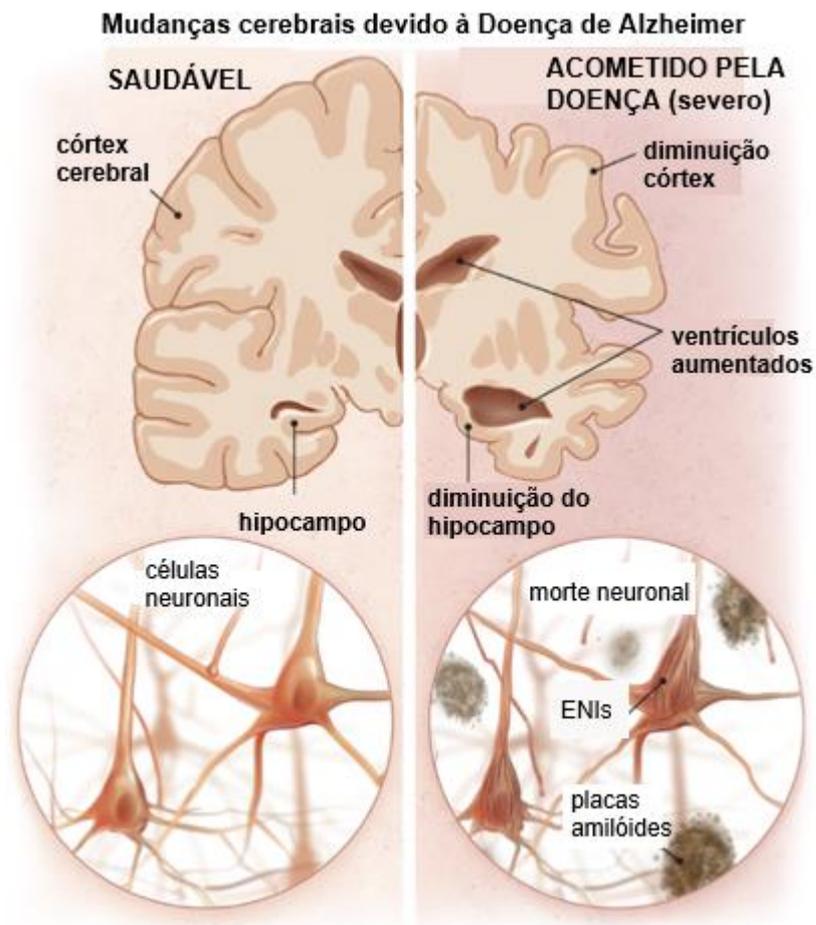
## 1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER E A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A condição de demência pode ser dividida em duas categorias: pré-senil ou senil. A demência pré-senil tem início antes dos 65 anos de idade, enquanto a demência senil tem início após os 65 anos de idade e essa separação ajuda na busca por causas genéticas da DA de início precoce (YOURGENOME, 2022). Demência é agora considerada uma síndrome caracterizada pela deterioração intelectual ocorrida em adultos, severa o suficiente para interferir em performances sociais e ocupacionais (KATZMAN, 1993).

Dentre as mudanças bioquímicas que ocorrem devido à DA (Figura 1), estão o acúmulo de placas amilóides, também chamadas de placas senis, contendo depósitos extracelulares do peptídeo beta-amilóide e a presença de emaranhados neurofibrilares intraneuronais (ENIs) que levam à neurotoxicidade (PORTELIUS et al., 2006). A densidade de placas senis no córtex cerebral está significativamente correlacionada com o grau de comprometimento cognitivo observado em pacientes antes da morte, embora seja possível encontrar depósitos de beta-amiloides em tecido cerebral saudável (YAMADA; NABESHIMA, 2000). Não obstante, ocorrem também déficits de ACh, norepinefrina (NE) e serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT), sendo o neurotransmissor ACh o mais profundamente afetado. Essa observação levou à postulação da hipótese colinérgica da DA, que engloba uma parte substancial das anormalidades cognitivas e de memória causadas pela doença.

A ACh é encontrada em vertebrados e artrópodes, sendo um dos principais compostos pelo qual os impulsos elétricos transportados pelas células nervosas são transmitidos a outra célula nervosa ou a músculos voluntários e involuntários (HUNT; DE M. TAVEAU, 1906). Desempenha um importante papel no que diz respeito aos processos de aprendizagem e memória, ativando receptores nicotínicos e muscarínicos do sistema nervoso central (SNC) (KÁSA; RAKONCZAY; GULYA, 1997).

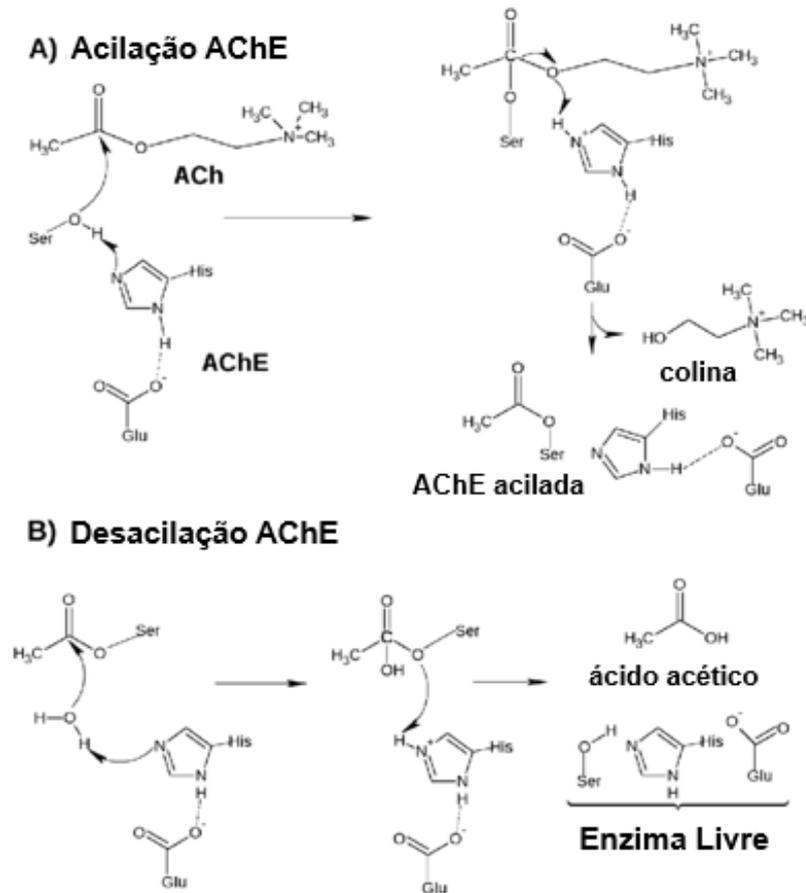
Figura 1 – Mudanças bioquímicas e estruturais que ocorrem no cérebro devido à DA



Fonte: Adaptado de Boersma. (2018).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é conhecida por sua alta eficiência, sendo capaz de catalisar a quebra de até 10.000 moléculas de ACh por segundo, mecanismo representado pela Figura 2 (PROTEIN DATA BANK IN EUROPE, [2022]). Ocorre em diferentes estruturas quaternárias, sendo todas elas pós-traducionais, onde apenas um gene codifica suas subunidades catalíticas (HUCKO; JÄRV; WEISE, 1991). A primeira estrutura primária completa de uma subunidade catalítica foi deduzida a partir de cDNA obtido do corpo da enguia elétrica *Torpedo californica*, possuidora de grandes quantidades dessa enzima (SCHUMACHER et al., 1986).

Figura 2 – Mecanismo de reação para hidrólise de ACh (acilação) catalisada pela AChE e mecanismo de desacilação da enzima



Fonte: Adaptado de Chatterjee et al. (2016).

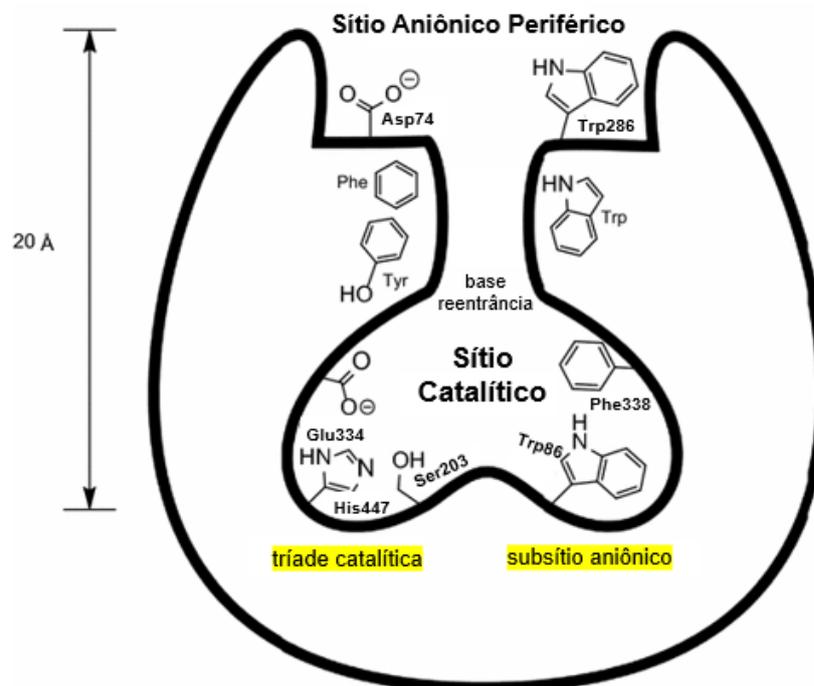
Antes da sua estrutura ser compreendida completamente, já se sabia existir dois sítios ativos para substratos positivamente carregados, chamados de “sítios aniônicos” (PROTEIN DATA BANK IN EUROPE, [2022]). Além disso, o sítio ativo principal da AChE não se encontra na superfície, mas a cerca de 20 Å de profundidade da mesma, compreendido em uma reentrância de 5 Å de largura rodeada de diversos resíduos de aminoácidos aromáticos, tendo o triptofano (Trp) como aminoácido predominante (XU et al., 2017).

As interações do substrato com os resíduos de aminoácidos aromáticos à sua volta se dão por meio das forças de van der Waals, de modo indireto (SCHUMACHER et al., 1986). No entanto, as forças de Coulomb também são importantes, ou seja, a dependência da ação inibitória da enzima com a força iônica implica que o sítio ativo aniônico possui uma “nuvem” negativa em sua superfície, em vez de uma cadeia lateral de aminoácidos com cargas negativas individuais.

O sítio aniônico periférico (PAS) se localiza mais próximo a superfície da enzima, sendo interpretado como um sítio alostérico, aquele que permite que o substrato ative, iniba ou desligue a atividade enzimática de determinada enzima, por meio de mudanças de conformação na estrutura da mesma (TAYLOR; LAPPI, 1975). Possui na sua estrutura o aminoácido Trp286, que tem como objetivo sequestrar ACh (XU et al., 2017). Logo, essa enzima forma uma interação  $\pi$ -cátion com o aminoácido Trp e a carbonila do grupo acetil forma uma ligação de hidrogênio fraca com um aminoácido tirosina (Tyr) localizado mais abaixo (PROTEIN DATA BANK IN EUROPE, [2022]).

Na base da reentrância, temos o subsítio aniônico (AS) que apresenta o resíduo aromático Trp86 e a tríade catalítica (CT) composta por Glu334, His447 e Ser203 (ROSENBERRY et al., 2017). Novamente temos a formação de uma interação  $\pi$ -cátion entre a amina quaternária localizada na ACh e o anel do Trp86 (PROTEIN DATA BANK IN EUROPE, [2022]). Além dos sítios citados anteriormente, a AChE (Figura 3) possui um 'bolsão acil', que confere especificidade ao substrato, e um 'buraco oxiânion', que interage com íons negativos de oxigênio durante a catálise, aumentando sua eficiência catalítica (ZHANG; KUA,; MCCAMMON, 2002).

Figura 3 – Representação sítio ativo AChE humana



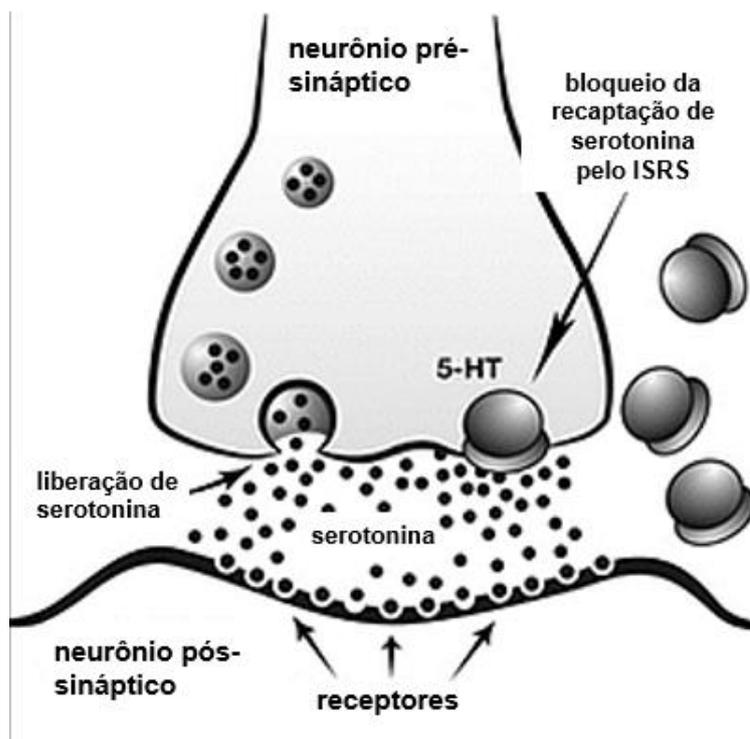
Fonte: Adaptado de Gorecki et al. (2016).

## 1.2 INIBIDORES DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA

Inicialmente, eram utilizados antidepressivos tricíclicos e aqueles com capacidade inibitória da enzima monoamina oxidase (MAOIs) como tratamento para a doença. Os medicamentos mais recentes foram aprovados para uso no final da década de 2000, incluindo os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs) e os inibidores de recaptção de serotonina e norepinefrina (SNRIs) (SANCHEZ; REINES; MONTGOMERY, 2014). Em um contexto geral, as novas classes de antidepressivos são mais bem toleradas que antidepressivos tricíclicos e MAOIs devido à diminuição dos efeitos colaterais resultantes do seu uso (GILLMAN, 2007).

Os ISRSs compartilham do mesmo mecanismo de ação, tendo como alvo principal o transportador de serotonina (SERT), responsável pela recaptção de 5-HT nos neurônios serotoninérgicos, como demonstrado pela Figura 4 (BLAKELY et al., 1991). A inibição da recaptção de 5-HT resulta em níveis extracelulares mais elevados de serotonina, efeito base da atividade antidepressiva (LAM et al., 2009). No entanto, os efeitos terapêuticos dos antidepressivos da classe dos ISRS não podem ser resumidos somente à inibição de SERT e, como tal, outros mecanismos de ação devem estar ocorrendo simultaneamente. A teoria atual postula que o estresse neuronal causado pelos ISRSs causa uma mudança na homeostase cerebral, resultando em uma regulação negativa de SERT em algumas áreas do cérebro e uma regulação positiva em outras (SANTARSIERI; SCHWARTZ, 2015). Esse mecanismo pode explicar o porquê de os efeitos terapêuticos completos do tratamento com tais antidepressivos não serem percebidos até quatro a seis semanas após seu início, apesar de haver alterações significativas imediatas no fluxo de serotonina.

Figura 4 – Representação do mecanismo de ação dos ISRSs



Fonte: Adaptado de Lattimore. (2005).

Dentre os ISRSs, a fluoxetina exibe a ligação menos específica no sítio ativo do SERT e, em altas doses, pode aumentar os níveis sinápticos de NE e dopamina, como reportado na literatura (BYMASTER et al., 2002). Seu uso tende a estar associado com taxas mais altas de perda de peso, agitação e ansiedade quando comparada com os demais antidepressivos contidos nessa classe, o que pode estar diretamente relacionado à sua especificidade de ligação reduzida (MARKEN; MUNRO, 2000).

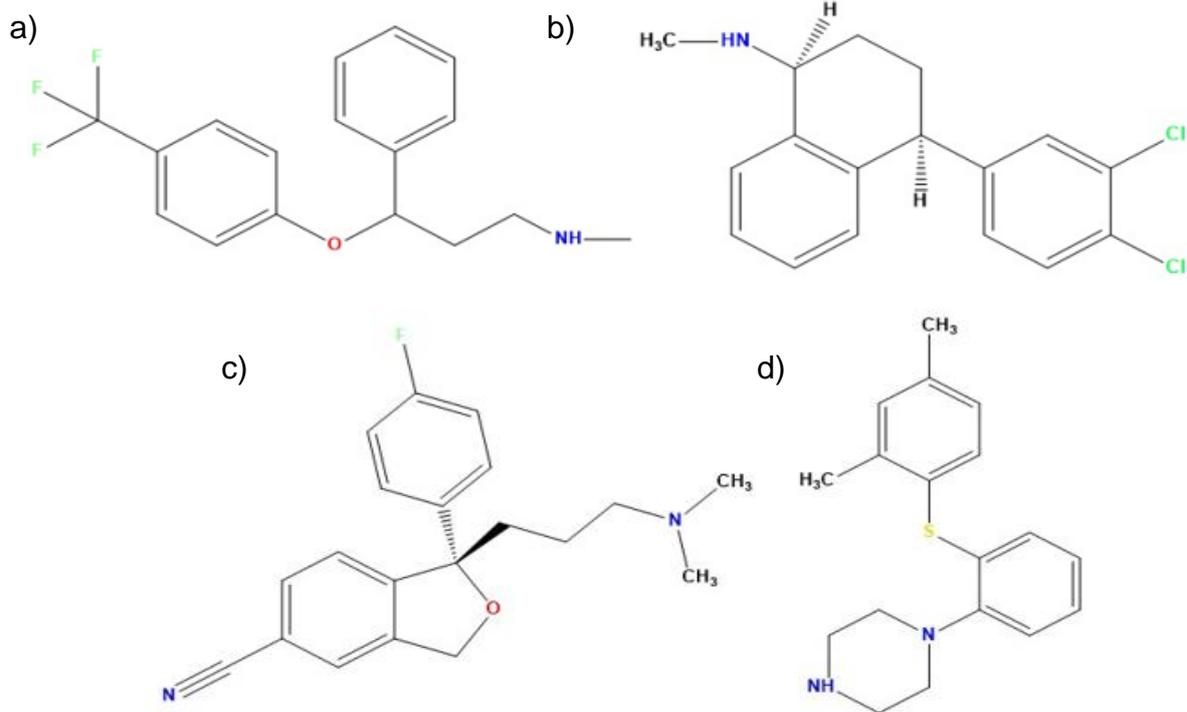
Comparada com outros ISRSs, a sertralina é considerada um inibidor potente e específico da recaptação de 5-HT no terminal pré-sináptico, mostrando também certa atividade como inibidor da recaptação de dopamina (HEYM; KOE, 1988). No entanto, a sertralina não possui atividade inibitória frente à recaptação de norepinefrina nem frente à monoamina oxidase, além de não possuir atividade anticolinérgica significativa (CIPRIANI et al., 2010).

Escitalopram é o S-enantiômero da mistura racêmica que constitui o citalopram (SÁNCHEZ; KREILGAARD, 2004), capaz de inibir, junto aos demais antidepressivos da classe dos ISRSs, também chamados de antagonistas, a função do SERT ao se ligarem ao seu sítio ativo principal, onde o substrato 5-HT se ligaria normalmente. Em

adição ao sítio ativo principal, o SERT possui um ou mais sítios alostéricos de ligação. Um composto tal como o escitalopram consegue ligar-se ao sítio alostérico, podendo modular as propriedades do sítio ativo principal, sem afetar diretamente a recaptção de serotonina (CHEN et al., 2005; SÁNCHEZ, 2006). Devido à essa propriedade, o escitalopram é também considerado um inibidor de recaptção alostérico de serotonina (IRAS).

Vortioxetina foi aprovada como medicação para o tratamento de TDM em setembro de 2013 nos Estados Unidos e posteriormente sua aprovação e uso se deu no mundo todo. A vortioxetina é considerada um ISRS, porém sua ação vai além, tendo mostrado várias outras atividades sobre receptores de 5-HT (MØRK et al., 2012). Possui alta afinidade com o SERT, mas não com transportadores de NE ou dopamina. A vortioxetina pode exercer efeitos antidepressivos ocupando menos de 50% do sítio ativo principal do SERT, enquanto demais ISRSs e SNRIs requerem ocupações de pelo menos 80% (MEYER et al., 2004). No geral, a vortioxetina é tanto um modulador quanto um estimulador de serotonina (KÖHLER et al., 2016). Sua estrutura está disposta na Figura 5, junto aos demais antidepressivos descritos anteriormente.

Figura 5 – Estruturas dos antidepressivos fluoxetina, sertralina, escitalopram e vortioxetina



Legenda: (a) Fluoxetina; (b) Sertralina; (c) Escitalopram; (d) Vortioxetina.

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

### 1.3 RELAÇÃO ENTRE ISRSs E A DOENÇA DE ALZHEIMER

Estudos já relataram que os antidepressivos fluoxetina, sertralina e amitriptilina são capazes de inibir a atividade da enzima AChE. No entanto, a potência inibitória desses três antidepressivos se mostrou diferente, provavelmente pela distinção estrutural entre os compostos (MÜLLER et al., 2002; AHMED et al., 2008).

Além disso, estudos anteriores revelaram que o fármaco citalopram é um importante inibidor das colinesterases, onde evidências clínicas e estudos de imagens sugerem que pacientes tratados com o inibidor anticolinesterásico galantamina, utilizado ativamente no tratamento da DA, podem ter benefícios adicionais quando também tratados com o ISRS citalopram. Resultados desses estudos mostraram um aumento na atividade cerebral após tratamento recorrente com ambos os fármacos (AHMED et al., 2008; SMITH et al., 2009).

#### 1.4 VANTAGENS NO USO DE MOLÉCULAS DE ORIGEM NATURAL

Um produto natural pode ser considerado uma entidade química, produzido por um organismo vivo de ocorrência natural, o qual contém componentes químicos únicos e estruturalmente diversos, além de propriedades farmacológicas que podem contribuir para a descoberta de novos medicamentos vitais à saúde humana (MATHUR; HOSKINS, 2017). Como exemplos de medicamentos de uso comum derivados de plantas, temos a aspirina, proveniente da casca do salgueiro (JI; LARREGIEU; BENET, 2016), a digoxina, da flor *Digitalis lanata* (GERWICK, 2017) e a morfina, proveniente do ópio (BUTLER, 2004). De fato, projeta-se que mais de 60% de todos os medicamentos sejam derivados de produtos naturais ou metabólitos secundários encontrados nos mesmos (EDDERSHAW; BERESFORD, 2000).

Medicamentos produzidos a partir de fontes sintéticas exercem menos efeitos terapêuticos com mais efeitos colaterais diversos (VALECHA et al., 2010). Dito isso, agentes terapêuticos provindos de fontes naturais podem diminuir significativamente ou até mesmo evitar efeitos colaterais indesejados, pois produzem efeitos fisiológicos e farmacológicos já em células vivas. Além disso, produtos naturais apresentam maior distribuição de propriedades moleculares, menor massa molecular, coeficiente de partição e alta diversidade estrutural (PASCOLUTTI; QUINN, 2014). Não obstante, são capazes de uma maior interação com proteínas, enzimas e demais moléculas e estruturas presentes no meio biológico (LAHLOU, 2013).

Diante disso, considerando o possível uso de inibidores de recaptção de serotonina como anticolinesterásicos, o presente estudo tem como objetivo avaliar o caráter inibitório de moléculas de origem natural, análogas em estrutura química aos antidepressivos fluoxetina, sertralina, escitalopram e vortioxetina, frente à enzima AChE.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a busca de novos fármacos com afinidade de ligação à enzima acetilcolinesterase (AChE), foram utilizados três diferentes bancos de dados virtuais de moléculas. O *Natural Products Atlas*, banco de dados de produtos naturais derivados de micróbios, abriga um total de 32.552 compostos, sendo eles 12.547 de origem bacteriana e 20.005 de origem fúngica (VAN SANTEN et al., 2021).

O banco de dados *Drug Bank* possibilita a busca por mais de 500.000 fármacos, aprovados ou em fase experimental (DRUGBANK, 2022). Por fim, o banco de dados *PubChem* abriga mais de 110 milhões de compostos, 277 milhões de substâncias e 292 milhões de moléculas bioativas, possibilitando a pesquisa de compostos químicos por nome, fórmula molecular, estrutura, dentre outros identificadores (PUBCHEM, 2022).

Para se realizar a busca nos bancos de dados citados acima, definiu-se uma estrutura base para cada um dos antidepressivos selecionados. A filtragem das subestruturas obtidas nos bancos de dados *Natural Products Atlas* e *Drug Bank* foi feita levando em consideração a Regra dos Cinco de *Lipinski* (LIPINSKI et al., 1997) que estabelece que um composto tem maior probabilidade de apresentar baixa absorção ou permeação quando dois ou mais dos seguintes critérios são violados: logP maior ou igual a 5, Massa Molecular menor ou igual a 500 Da, aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio (DLH) menor ou igual a 5 (BICKERTON; BESNARD; HOPKINS, 2012). Além disso, apenas moléculas de origem natural foram consideradas.

No caso do banco de dados *PubChem*, além da Regra dos Cinco de *Lipinski*, se fez necessária a adição de outro critério: foram escolhidas somente moléculas atualmente comercializadas, para facilitar o possível uso destas em ensaios enzimáticos futuros.

Para avaliar o perfil farmacêutico dessas moléculas, utilizou-se a ferramenta de livre acesso *pkCSM* (2022) que realiza a predição de propriedades farmacocinéticas de pequenas moléculas usando assinaturas baseadas em gráficos (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Das propriedades avaliadas pelo método ADMET, acrônimo utilizado na farmacocinética e na farmacologia para "absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade" e que descreve a disposição de um composto farmacêutico em um organismo (GUAN et al., 2019), observou-se a solubilidade em

água do composto e toxicidade AMES - teste usado para avaliar o potencial efeito carcinogênico de substâncias químicas utilizando a cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* (JAIN et al., 2018). Além disso, foi levado em consideração a hepatotoxicidade e toxicidade aguda oral em ratos, avaliado pela quantidade de uma substância, dada de uma só vez, que causa a morte de 50% (metade) de um grupo teste de ratos ( $DL_{50}$ ) (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

As moléculas que apresentaram  $DL_{50}$  com valores acima do padrão obtido a partir do antidepressivo selecionado e/ou resultaram em hepatotoxicidade e/ou toxicidade de AMES positiva, foram automaticamente excluídas do estudo. As moléculas selecionadas foram criadas usando o software Avogadro 1.2.0 seguindo o método MMFF94, seguido de otimização semi-empírica da geometria PM6 (STEWART, 2007) usando o programa MOPAC2016 (JAMES, 2016).

A estrutura cristalográfica da enzima alvo, AChE humana, encontra-se disponível no banco de dados de proteínas PDB (*Protein Data Bank*), sob o código 4EY6 (CHEUNG et al., 2012). Foi levado em consideração uma resolução (R) da sua estrutura experimental em  $R = 2,40 \text{ \AA}$  e a presença de um inibidor, galantamina, para comparação com as demais moléculas estudadas.

A simulação de *docking* molecular foi utilizada como segunda triagem, visando buscar compostos com maior capacidade inibitória e propor um modelo de interação.

Para simular o modo de ligação das interações entre as moléculas selecionadas e a enzima AChE humana, foi utilizado o programa *Auto Dock Vina 1.1.1* (TROTT; OLSON, 2010) com exaustividade de 200, de acordo com a literatura, utilizando uma rede altamente conservada de moléculas de água na AChE humana. O gridbox foi centrado nas coordenadas:  $x = -13,25$ ,  $y = -46,76$  e  $z = 33,52$ , com as dimensões:  $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$  (DA SILVA et al., 2020).

Após a obtenção dos ligantes e da enzima, suas estruturas foram convertidas para o formato *pdbqt*, utilizando o programa *Auto Dock Tools 4.2* (MORRIS et al., 2009), no qual todas as ligações rotativas dos ligantes puderam girar livremente, e os receptores foram considerados rígidos. Outras configurações foram consideradas padrão. O protocolo de *redocking* levou em consideração um valor de RMSD de  $0,36 \text{ \AA}$  para a galantamina (DA SILVA et al., 2020), este que mede o desvio quadrático médio das posições atômicas, com valores preferencialmente menores que  $2 \text{ \AA}$ , é um critério frequentemente usado para corrigir a previsão de estrutura vinculada (BURSULAYA et al., 2003). As estruturas com energias livres de ligação próximas ao

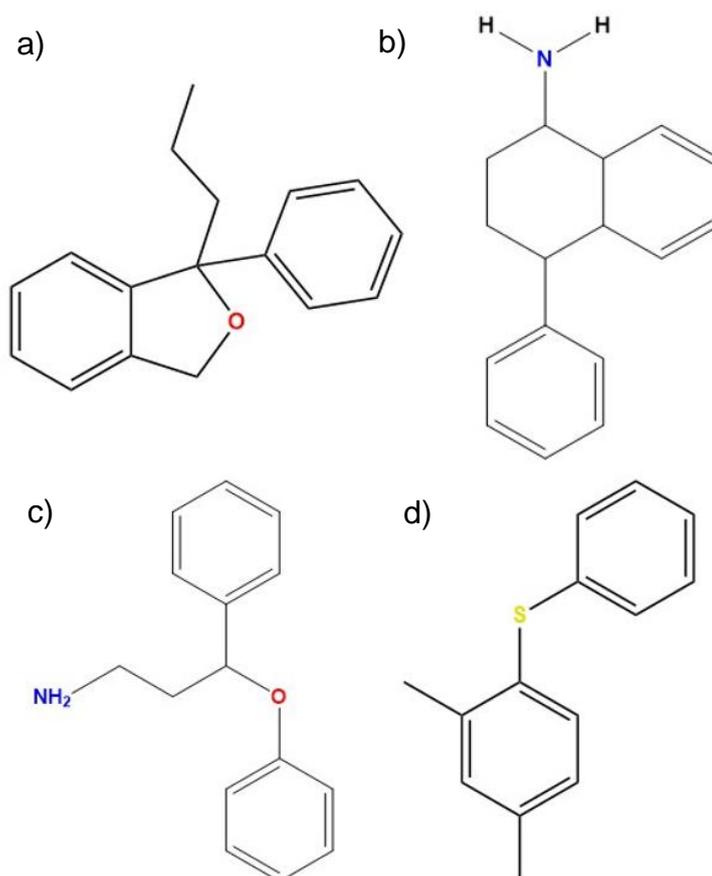
valor demonstrado pela galantamina, experimentalmente e pela literatura (DA SILVA et al., 2020), de -10,5 kcal/mol, foram selecionadas e analisadas usando *BIOVIA Discovery Studio* (ACCELRYS, 2017).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DAS SUBESTRUTURAS

A Figura 6 evidencia as subestruturas escolhidas, determinadas a partir dos antidepressivos utilizados como base para o estudo.

Figura 6 – Subestruturas relativas aos antidepressivos utilizados como base para o estudo



Legenda: (a) Subestrutura escitalopram; (b) Subestrutura sertralina; (c) Subestrutura fluoxetina; (d) Subestrutura vortioxetina.

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

Devido à grande quantidade de moléculas presentes no banco de dados *PubChem*, utilizou-se mais de um critério para filtragem das mesmas. Em um primeiro momento, obteve-se 493 resultados referentes à subestrutura do escitalopram, de acordo com os seguintes critérios dispostos na plataforma: massa molar entre 300 e 400 Da, HBD de no mínimo 0 e máximo 5, HBA de no mínimo 0 e máximo 10, XLogP

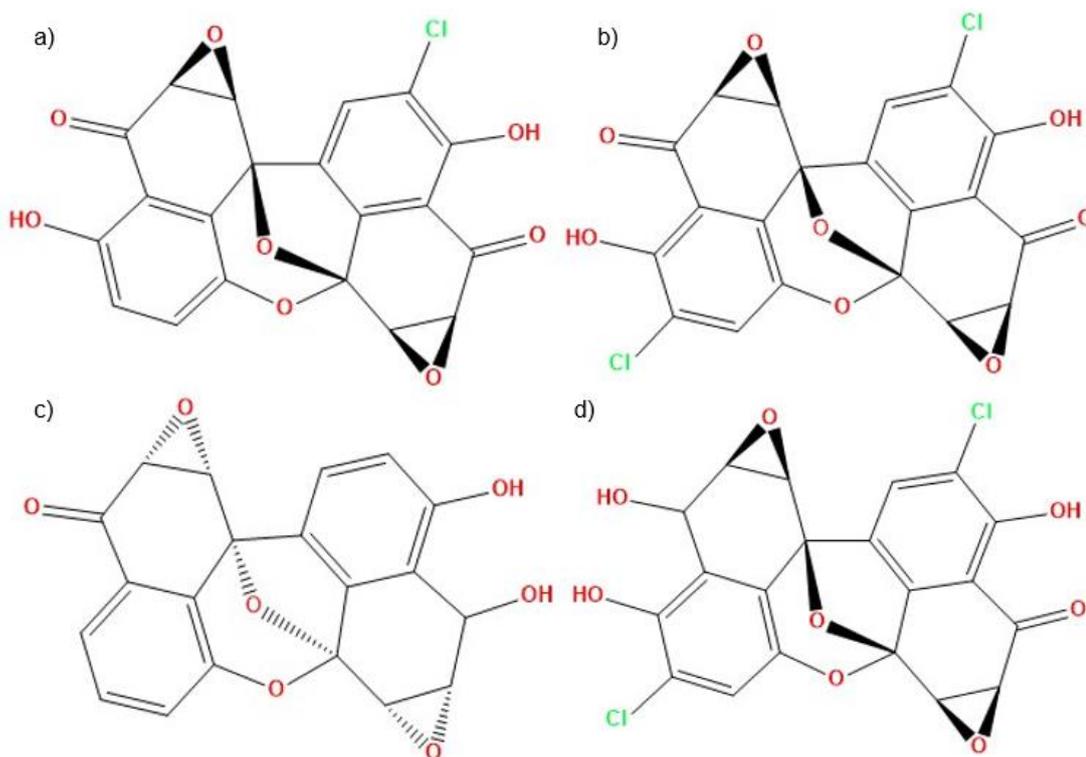
entre 5 e 8. Para os antidepressivos fluoxetina, sertralina e vortioxetina, foram utilizados os mesmo critérios, obtendo-se, respectivamente, 1.394, 975 e 766 resultados. Com a aplicação inicial da Regra dos Cinco de *Lipinski*, diminuiu-se a quantidade de moléculas para 42, 201, 36 e 108.

Por se tratar ainda de um número elevado de compostos a serem analisados, um último critério foi aplicado: a existência da subestrutura no mercado, disponível para compra, objetivando a obtenção destas para ensaios de inibição enzimática. Ainda a Regra dos Cinco de *Lipinski* foi usada mais uma vez, restringindo os resultados em 6, 35, 2 e 6 para escitalopram, fluoxetina, sertralina e vortioxetina, respectivamente.

O banco de dados *Natural Products Atlas* forneceu apenas 7 resultados de subestruturas compatíveis para o escitalopram, 4 para sertralina e 2 para vortioxetina. Não houve a necessidade de utilização de quaisquer critérios adicionais. Além disso, não foram encontrados resultados para as subestruturas relativas ao antidepressivo fluoxetina dentro do desejado. Para o banco de dados *Drug Bank* foi possível se obter 3 subestruturas análogas em estrutura química ao escitalopram, 9 para fluoxetina, 3 para sertralina e 4 para vortioxetina, sem necessidade de critérios adicionais.

Na Figura 7 estão exemplificadas as estruturas das moléculas selecionadas, análogas em estrutura química à subestrutura relativa ao antidepressivo escitalopram, que se adequaram parâmetros de *Lipinski* e não apresentaram toxicidade.

Figura 7 – Compostos análogos à subestrutura do escitalopram



Legenda: (a) Spiroxin A; (b) Spiroxin B; (c) Spiroxin D; (d) Spiroxin E.

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

No Quadro 1 temos seus valores de acordo com cada parâmetro analisado, provenientes do banco de dados *Natural Products Atlas*. A segunda coluna mostra os valores para o antidepressivo base. Não foram encontrados resultados que se adequassem aos critérios nos bancos de dados *Drug Bank* e *PubChem*.

Quadro 1 – Valores para Regra dos Cinco de *Lipinski*, solubilidade, DL50 e toxicidade para compostos análogos à subestrutura do escitalopram

Ligante	Escitalopram	Spiroxin A	Spiroxin B	Spiroxin D	Spiroxin E
<b>Massa (&lt;500 Da)</b>	324,399	412,737	412,182	364,309	449,198
<b>DLH</b>	0	2	2	2	3
<b>ALH</b>	3	8	8	7	8
<b>LogP</b>	3,813	1,498	2,151	0,989	2,002
<b>Ligações Rotacionáveis</b>	5	0	0	0	0
<b>Área (Å<sup>2</sup>)</b>	141,834	166,042	176,345	151,577	176,978

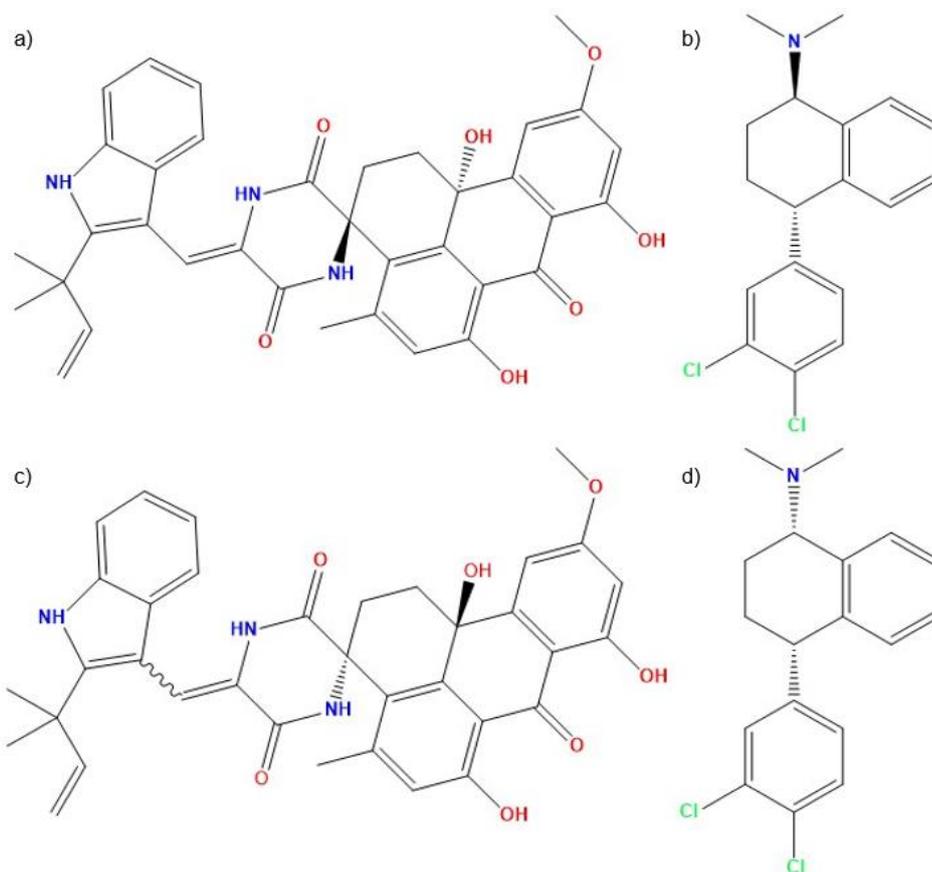
<b>Hepatotoxicidade</b>	Não	Não	Não	Não	Não
<b>Toxicidade AMES</b>	Não	Não	Não	Não	Não
<b>Solubilidade (log mol/L)</b>	-4,480	-3,112	-3,119	-2,772	-2,889
<b>DL<sub>50</sub> (mol/kg)</b>	2,918	2,971	2,973	2,870	2,895

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

Para as moléculas derivadas da subestrutura do antidepressivo fluoxetina, não foram encontrados resultados satisfatórios em nenhum dos três bancos de dados analisados.

Na Figura 8 estão exemplificadas as estruturas das moléculas selecionadas, análogas em estrutura química à subestrutura relativa ao antidepressivo sertralina, que se adequaram aos critérios de *Lipinski* e não apresentaram toxicidade.

Figura 8 – Compostos análogos à subestrutura da sertralina



Legenda: (a) (+)-variecolortin B; (b) Dasotralina; (c) (±)-variecolortin B; (d) Desmetilsertralina.

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

O Quadro 2 dispõe das moléculas selecionadas dos bancos de dados *Natural Products Atlas* e *Drug Bank*, respectivamente, análogas em estrutura química à subestrutura relativa do antidepressivo sertralina, conforme critérios discutidos anteriormente. Não foram encontrados resultados adequados no banco de dados *PubChem*.

Quadro 2 – Valores para Regra dos Cinco de *Lipinski*, solubilidade, DL<sub>50</sub> e toxicidade para compostos análogos à subestrutura da sertralina

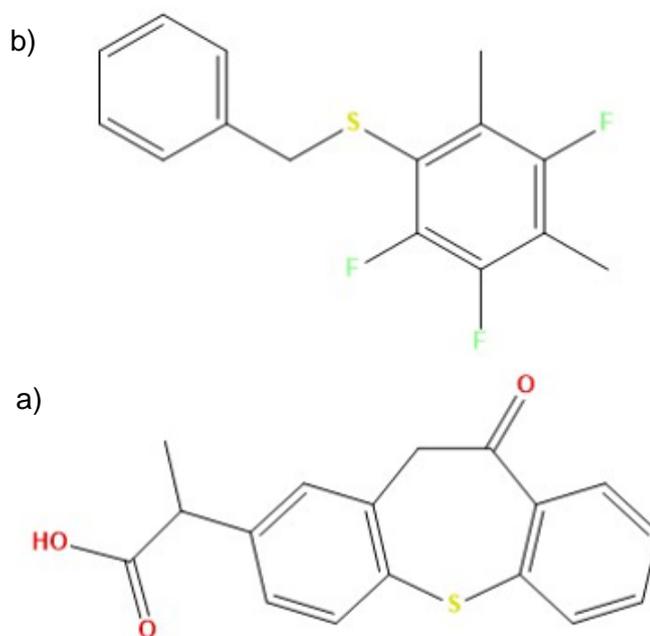
Ligante	Sertralina	(+) variecolortin B	(±) variecolortin B	Desmetilsertralina	Dasotralina
<b>Massa (&lt;500 Da)</b>	306,236	<b>619,674</b>	<b>619,674</b>	292,209	292,209
<b>DLH</b>	1	<b>6</b>	<b>6</b>	1	1
<b>ALH</b>	1	7	7	1	1
<b>LogP</b>	5,1796	4,41622	4,41626	4,9189	4,9189
<b>Ligações Rotacionáveis</b>	2	4	4	1	1
<b>Área (Å<sup>2</sup>)</b>	129,464	263,959	263,959	122,889	122,889
<b>Hepatotoxicidade</b>	Sim	Não	Não	Não	Não
<b>Toxicidade AMES</b>	Não	Não	Não	Não	Não
<b>Solubilidade (log mol/L)</b>	-5,051	-3,002	-3,002	-4,177	-4,177
<b>DL<sub>50</sub> (mol/kg)</b>	2,807	2,913	2,913	3,002	3,002

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

Destacado em negrito, tem-se a violação de dois dos critérios estabelecidos por *Lipinski*, estes que permitem uma boa previsão do perfil de biodisponibilidade oral para moléculas novas. No entanto sabe-se que 16% dos medicamentos administrados via oral disponíveis no mercado violam ao menos um dos critérios estabelecidos citados anteriormente e 6% falham em dois ou mais (BICKERTON; BESNARD; HOPKINS, 2012)., tais como atorvastatina, montelucaste, docetaxel, telmisartana, tacrolimo, leuprolida e olmesartana (GIMÉNEZ et al., 2010). A implementação de regras como filtros resulta somente em uma aprovação ou reprovação qualitativa, logo todos os compostos que cumprem as regras são considerados iguais, assim como aqueles que as infringem (BICKERTON; BESNARD; HOPKINS, 2012).

A busca por moléculas similares à subestrutura do antidepressivo vortioxetina não gerou resultados satisfatórios no banco de dados *Natural Products Atlas*. Para os demais bancos de dados, os resultados estão dispostos no Quadro 3 e a Figura 9 mostra as estruturas das moléculas selecionadas, que se adequaram aos critérios impostos.

Figura 9 – Compostos análogos à subestrutura da vortioxetina



Legenda: (a) 1-Benzilsulfanyl-2,3,5-trifluoro-4,6-dimetilbenzeno (BStFdMB); (b) Zaltoprofen.

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

Quadro 3 – Valores para Regra dos Cinco de *Lipinski*, solubilidade, DL<sub>50</sub> e toxicidade para compostos análogos à subestrutura da vortioxetina

Ligante	Vortioxetina	Zaltoprofen	BStFdMB
<b>Massa (&lt;500 Da)</b>	298,455	298,366	282,33
<b>DLH</b>	1	1	0
<b>ALH</b>	3	3	1
<b>LogP</b>	3,86425	3,7647	5,01304
<b>Ligações Rotacionáveis</b>	3	2	3
<b>Área (Å<sup>2</sup>)</b>	131,105	126,548	114,203
<b>Hepatotoxicidade</b>	Não	Não	Não
<b>Toxicidade AMES</b>	Não	Não	Não
<b>Solubilidade</b>	-3,89	-2,887	-5,364

<b>(log mol/L)</b>			
<b>DL<sub>50</sub> (mol/kg)</b>	2,317	2,363	2,963

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

### 3.2 PROTOCOLO DE *DOCKING* MOLECULAR

O protocolo de *docking* molecular foi executado para as 10 moléculas dispostas anteriormente, nas Figuras 5, 6 e 7, que não apresentaram nenhum tipo de toxicidade. Sua solubilidade e valores de  $DL_{50}$  também foram levados em consideração. Para cada uma das 10 moléculas, foram analisados seus isômeros R e S, juntamente ao inibidor galantamina na cadeia A da enzima AchE humana. Ao avaliarmos os valores de energia em kcal/mol, temos 4 ligantes que se destacam: (1) (2'S, 11bR)-variecolortin B, com uma energia de -9.5 kcal/mol; (2) (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E, com energia de -9.4 kcal/mol; (3) (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B, com energia também de -9.4 kcal/mol; e por fim, (4) (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B, com energia igual a -9.2 kcal/mol. A galantamina apresentou energia de ligação de -10,5 kcal/mol.

### 3.3 ANÁLISE DE INTERAÇÕES POR *DOCKING* MOLECULAR

O complexo inibidor-proteína com (2'S, 11bR)-variecolortin B foi capaz de realizar seis interações hidrofóbicas no total, sendo três delas do tipo  $\pi$ - $\pi$  - anéis  $\pi$  são definidos como sistemas de anéis planares compostos por átomos  $sp^2$  hibridizados, dentre eles anéis aromáticos, com uma distância máxima de 6,0 Å por *default* - e outras três do tipo  $\pi$ -alquil, que ocorrem a uma distância máxima de 5,5 Å do centro de um anel  $\pi$  ao centro do grupamento alquil (ACCELRYS, 2017), além de três ligações de hidrogênio. Nas interações hidrofóbicas participaram os resíduos Trp-286, Tyr-337, Phe-338 e Tyr-341. As ligações de hidrogênio ocorreram entre o ligante e os resíduos Arg-296, Tyr-72 e Ser-293, classificadas como convencionais, admitindo distâncias de ligação de 3,4 a 3,8 Å (ACCELRYS, 2017). Todas as interações deste complexo inibidor-proteína apresentaram distâncias de ligação aceitáveis para os parâmetros impostos pelo programa utilizado, de até no máximo 5,2 Å (Quadro 4) e são exibidas na Figura 10 logo abaixo.

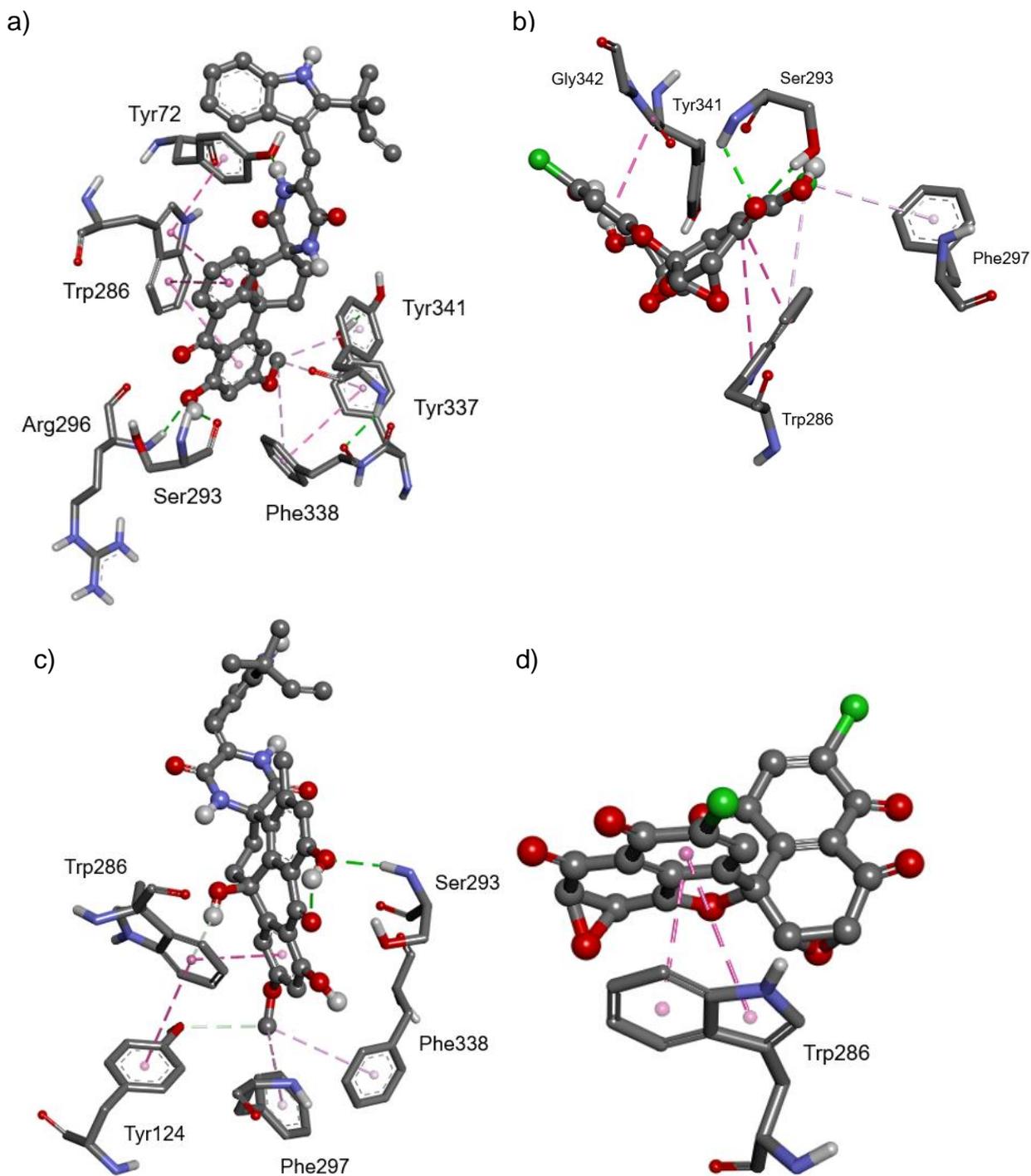
Quadro 4 – Interações ligante-proteína e distâncias de ligação

<b>(2'S, 11bR)-variecolortin B</b>			<b>(1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E</b>		
Interações Hidrofóbicas			Interações Hidrofóbicas		
Resíduo	AA	Distância (Å)	Resíduo	AA	Distância (Å)
284	Trp	4,6	286	Trp	5,3
285	Trp	4,5	286	Trp	3,9
286	Trp	4,6	286	Trp	4,9
337	Tyr	5,2	297	Phe	4,8
338	Phe	5,1			
341	Tyr	4,0			
Ligações de Hidrogênio			Ligações de Hidrogênio		
Resíduo	AA	Distância (Å)	Resíduo	AA	Distância (Å)
72	Tyr	2,2	293	Ser	2,4
293	Ser	1,0	293	Ser	2,0
296	Arg	2,3			
<b>(2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B</b>			<b>(1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B</b>		
Interações Hidrofóbicas			Interações Hidrofóbicas		
Resíduo	AA	Distância (Å)	Resíduo	AA	Distância (Å)
286	Trp	4,3	286	Trp	4,4
297	Phe	5,2	286	Trp	3,9
338	Phe	5,0			
Ligações de Hidrogênio					
Resíduo	AA	Distância (Å)			
124	Tyr	3,5			
286	Trp	2,4			
293	Ser	2,2			

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

Para o (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E, ocorreram quatro interações hidrofóbicas com a proteína, sendo duas delas do tipo  $\pi$ - $\pi$  e outras duas do tipo  $\pi$ -alquil, nos seguintes resíduos: Trp-286 e Phe-297. Além disso, o resíduo Ser-293 realizou duas ligações de hidrogênio convencionais com o receptor (Figura 10). Com exceção de uma das interações hidrofóbicas  $\pi$ - $\pi$  do resíduo Trp-286 que apresentou uma distância de ligação de 5,3 Å, as demais interações exibiram distâncias iguais ou inferiores à 4,9 Å (Quadro 4).

Figura 10 – Interações das moléculas selecionadas com o sítio ativo da enzima AChE



Legenda: (a) (2'S, 11bR)-variecolortin B; (b) (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E; (c) (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B; (d) (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B.

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

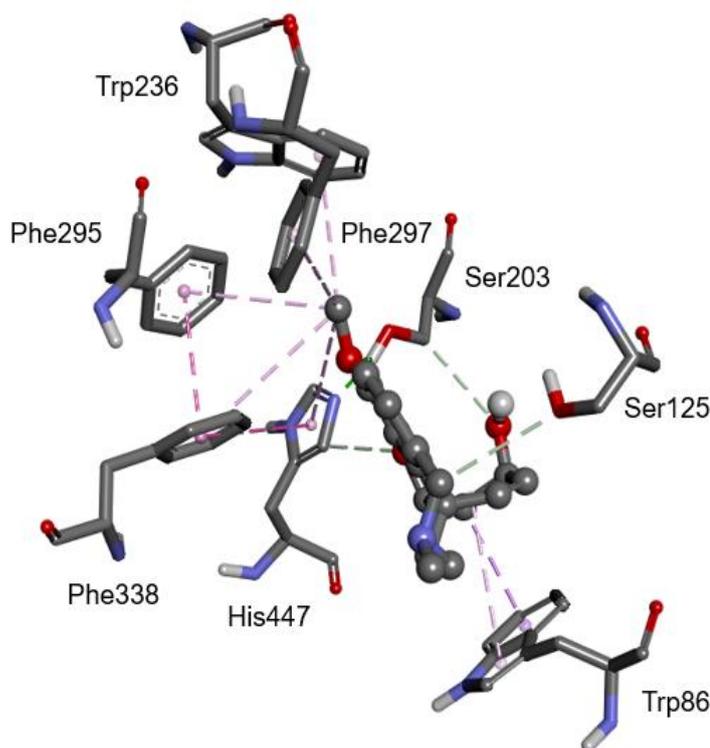
O composto (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B apresentou um total de três interações hidrofóbicas, duas delas do tipo  $\pi$ -alquil e uma do tipo  $\pi$ - $\pi$ , originadas dos resíduos Phe-338 e Phe-297, respectivamente. Este exibiu também três ligações de

hidrogênio: com o resíduo Ser-293, trata-se de uma ligação de hidrogênio convencional, enquanto para o resíduo Tyr-124 observou-se uma ligação de carbono-hidrogênio, onde em ambos os casos os resíduos atuaram como doadores de hidrogênio (Figura 10). Ocorreu também uma ligação de hidrogênio do tipo  $\pi$ -doador, originada do resíduo de Trp-286, com uma distância máxima aceita de 4,2 Å por *default* (ACCELRYS, 2017). Todas as interações exibiram distâncias de ligações iguais ou inferiores à 5,2 Å, conforme mostrado no Quadro 4.

Por fim, o ligante (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B apresentou somente duas interações com o sítio ativo, ambas de caráter hidrofóbico do tipo  $\pi$ - $\pi$ , originadas do resíduo Trp-286, como mostrado na Figura 10. Essas interações resultaram em distâncias de ligação iguais à 3,9 Å e 4,4 Å, respectivamente. (Quadro 4).

O controle utilizado, galantamina, tem suas interações com a proteína exemplificadas na Figura 11 e o Quadro 5 mostra a distância de ligação para cada interação feita.

Figura 11 – Interação do controle galantamina com o sítio ativo da enzima AChE



Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

Quadro 5 – Interações controle-proteína e distâncias de ligação

<b>Galantamina</b>		
Interações Hidrofóbicas		
Resíduo	AA	Distância (Å)
86	Trp	3,7
86	Trp	4,5
236	Trp	4,5
295	Phe	4,4
297	Phe	4,5
338	Phe	5,1
447	His	5,1
Ligações de Hidrogênio		
Resíduo	AA	Distância (Å)
125	Ser	3,7
203	Ser	2,4
203	Ser	3,7
447	His	3,2

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

Dentre as interações hidrofóbicas para o controle galantamina, observou-se seis interações do tipo  $\pi$ -alquil, entre os resíduos de Trp-86, Trp-236, Phe-295, Phe-297, Phe-338 e His-447 e o carbono da porção éter da molécula, todas com distâncias aceitáveis de até no máximo 5,5 Å e uma única interação  $\pi$ -sigma, com o resíduo de Trp-86 em uma distância de 4,5 Å, que admite distâncias de ligação somente até 4,1 Å por *default* (ACCELRYS, 2017). Das interações por ligação de hidrogênio, somente a ocorrida entre o controle e o resíduo de Ser-203 se caracterizou como convencional, dentro do limite aceito. As demais, ligações tipo carbono-hidrogênio, também se mantiveram dentro do limite máximo de 3,8 Å.

#### 4.4 ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS NATURAIS

O composto (+)-variecolortin B (nome comum), chamado também de (2'R,5'Z,11bR)-5'-[[2-(1,1-dimetil-2-propen-1-il)-1H-indol-3-il]metileno]-1,11b-dihidro-6,8,11b-trihidroxi-10-metoxi-4-metilspiro[3H-benz[de]antraceno-3,2-piperazina-

3',6',7(2H)-triona (CAS SciFinder<sup>n</sup>, 2023) e fórmula molecular  $C_{36}H_{33}N_3O_7$ , foi originalmente isolado a partir do fungo chamado *Eurotium*, proveniente do Mar da China Meridional, consiste em um gênero de fungo filamentososo do filo *Ascomycota*, frequentemente isolado de ambientes hiper salinizados e descoberto produzir alcalóides dicetopiperazina e policetídeos (ZHONG et al., 2018). Esse ambiente extremo pode causar a ativação de certos genes silenciosos e induzir vias de biossíntese únicas, favorecendo a produção de compostos estruturalmente únicos (WANG et al., 2007).

Mais de 3.000 metabólitos secundários já foram reportados a partir de fungos marinhos, incluindo policetídeos, alcalóides, meroterpenóides e peptídeos cíclicos. Esses compostos exibem várias atividades biológicas, como atividades antibacterianas, antitumorais, antivirais e anti-inflamatórias (CARROLL et al., 2019; HWANG et al., 2019; BAO et al., 2018).

Seu nome comum deriva da descoberta da cepa de fungo B-17, nomeada como *Aspergillus variecolor*, também chamados de variecolortides, isolada de sedimentos coletados no campo de sal de Jilantai da Mongólia, Alashan, China (WANG et al., 2007). Diferem-se estruturalmente devido à presença de uma rara fração tetracíclica ciclo-hexeno-antrona 6/6/6/6, em vez da unidade pirano-antrona encontrada nos variecolortides (ZHONG et al., 2018). Seu ID no *Natural Products Atlas* é NPA023948 e 139591160 no banco de dados *PubChem*.

O composto ( $\pm$ )-variecolortin B (nome comum), também chamado de (2'S,11bR)-5'-[[2-(1,1-dimetil-2-propen-1-il)-1H-indol-3-il]metileno]-1,11b-dihidro-6,8,11b-trihidroxí-10-metoxi-4-metilspiro[3H-benz[de]antraceno-3,2-piperazina-3',6',7(2H)-triona (CAS SciFinder<sup>n</sup>, 2023) e fórmula  $C_{36}H_{33}N_3O_7$  tal qual citado anteriormente. Isso ocorre pois o mesmo consiste de uma mistura racêmica das moléculas de (+)-variecolortin B e (-)-variecolortin B, tendo sido isolado do mesmo fungo *Eurotium*, na mesma localidade. Possui ID NPA032435 no banco de dados *Natural Products Atlas* e 156583062 no *PubChem*.

A cepa fúngica LL-37H248 foi isolada de um coral laranja suave coletado nas águas de Dixon Bay, Ilha de Vancouver, Canadá. Sua purificação levou às espiroxinas A - E (MCDONALD et al., 1999). A estrutura de tais compostos pode ser descrita como dois anéis de naftaleno parcialmente saturados unidos por espirocetais e ligações carbono-carbono. A porção saturada de cada anel de naftaleno é unida a um epóxido,

resultando em um sistema de anel octacíclico incomum, presente tanto na molécula de Spiroxin E quanto Spiroxin B (nomes comuns) (SHU et al., 2021).

O composto Spiroxin E possui nome 6H,11H-1b,7b-epoxibisoxireno[2,3]nafta[1,8-bc:1',8'-ef]oxepin-11-ona,4,9-dicloro-1a,6a,7a,11a tetrahidro-5,6,10-trihidroxi-,(1aR, 1bS, 6aR, 7aR, 7bS, 11aS) (CAS SciFinder<sup>n</sup>, 2023) e fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, enquanto o composto Spiroxin B possui nome (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-4,9-dicloro-1a,6a,7a,11a-tetrahidro-5,10-dihidroxi-6H,11H-1b,7b-epoxibisoxireno[2,3]nafta[1,8-bc:1',8'-ef]oxepina-6,11-diona (CAS SciFinder<sup>n</sup>, 2023) e dois hidrogênios a menos na sua fórmula molecular, sendo ela C<sub>20</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Além disso, teve sua ação antibiótica comprovada e patenteada (MCDONALD et al., 1999). Suas identificações são NPA003285 e NPA006584, respectivamente, no *Natural Products Atlas* e 10072382 e 10366321, respectivamente, no banco de dados *PubChem*.

Foram analisadas as propriedades físico-químicas dos compostos citados acima de acordo com os critérios de *Lipinski*. Os resultados estão exibidos abaixo no Quadro 6.

Quadro 6 – Propriedades físico-químicas dos compostos (2'S, 11bR)-variecolortin B, (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B, (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E e (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B de acordo com a Regra dos Cinco de *Lipinski*

Ligante	Massa (<500 Da)	DLH	ALH	LogP	Ligações Rotacionáveis
(2'S, 11bR)-variecolortin B	619,674	6	7	4,41622	4
(2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B	619,674	6	7	4,41622	4
(1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E	412,182	2	8	2,1510	0
(1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B	449,198	3	8	2,0017	0

Fonte: elaborado pela pesquisadora (2023).

## 4 DISCUSSÃO

O sítio aniônico periférico (PAS), também chamado de sítio P, presente na AChE, é revestido de resíduos aromáticos, os quais possuem um papel fundamental na ligação e orientação de substratos aromáticos e catiônicos em seu caminho do sítio P ao sítio A, sítio ativo principal da enzima. Os resíduos aromáticos Trp-286, Tyr-124, Tyr-72 e Tyr-341, presentes no sítio P da AChE humana (hAChE), formam interações  $\pi$ -cátion com o neurotransmissor ACh, orientando sua molécula a deslizar e ligar-se aos resíduos Trp-86 e Tyr-337 localizados no sítio A (AS), também chamado de sítio de ligação da colina, onde estará corretamente alinhado ao resíduo de serina catalítica (Ser-203) (ROSENBERRY et al., 2017), que compõe a tríade catalítica Ser-His-Glu, favorecendo a nucleofilicidade da Ser-203, uma vez que a forte ligação de hidrogênio que ocorre entre Ser-203 e His-447 melhora a capacidade do ataque nucleofílico no substrato, enquanto o Glu-334 estabiliza o cátion histidínio no seu estado de transição (ZHANG; KUA,; MCCAMMON, 2002). Quando isso acontece, os resíduos Phe-295, Phe-297 e Trp-286 formam o sítio de ligação do acetil, que acomoda firmemente a parte acetil do substrato.

Dos resíduos aromáticos presentes no sítio P da enzima, conforme citado anteriormente, nenhum deles realizou interações com o controle galantamina, enquanto Trp-286 aparece nas quatro moléculas analisadas, Tyr-341 e Tyr-72 somente na (2'S,11bR)-variecolortin B e Tyr-124 somente na (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B. Entre os resíduos que compõem o sítio A, somente o Trp-86 interagiu com o controle, mostrando-se ausente na análise das demais moléculas, o que também ocorreu para o resíduo Trp-337.

Apesar da serina catalítica realizar ligações de hidrogênio somente com o controle, a presença de diversas interações hidrofóbicas do resíduo Trp-286 com os demais ligantes análogos em estrutura química aos antidepressivos, sugere uma boa acomodação do substrato com a enzima, havendo a formação do sítio de ligação do acetil. Os compostos (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E e (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B apresentaram interações com o resíduo Phe-297, reforçando esse mecanismo.

Comparando as distâncias de ligação dos ligantes com as do inibidor, quando tratando-se das interações hidrofóbicas, a galantamina apresentou uma menor distância de ligação com o resíduo Phe-297 do que os ligantes

(1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E e (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B. Somente o inibidor apresentou uma interação direta com o resíduo Ser-203, com distância de ligação de 2,4 Å. Essa discrepância de interações entre inibidor e ligante pode ser explicado pela pouca elucidação que existe em se tratando do mecanismo de ligação enzima-substrato para cada uma das moléculas estudadas, além das diferenças estruturais dentre elas, favorecendo certas interações em detrimento de outras.

No entanto, a maioria dos compostos candidatos a fármacos falham durante ensaios clínicos por apresentarem um perfil farmacocinético inadequado. Para evitar que isso aconteça, estratégias atuais consistem em definir o perfil ADMET de novas moléculas visando a seleção e desenvolvimento daquelas semelhantes a medicamentos com perfil farmacocinético ótimo. Os compostos (2'S,11bR)-variecolortin B e (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B violaram dois dos cinco critérios de *Lipinski*. Já para os compostos (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E e (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B não ocorreram violações (Quadro 5). Todos os antidepressivos usados como modelo apresentam uma violação única dentre os critérios de *Lipinski*.

Tratando-se das energias de ligação geradas a partir do protocolo de *docking molecular*, observou-se que os compostos estudados como possíveis inibidores apresentaram energias de ligação menores (mais positivas) quando comparados ao controle. Importante ressaltar que se trata de uma busca por inibidores reversíveis da AChE, tal como a galantamina, que realiza inibição competitiva dependente de concentração e quando sua concentração se encontra em declínio, a enzima retorna à sua função original (MOSS, 2020). Faz-se necessário a realização de testes *in vitro* em *in vivo* para real avaliação do potencial inibitório destes compostos e seus mecanismos (AHMED et al., 2022), levando em consideração não somente suas energias de ligação frente à enzima, mas também valores de CI50 – também chamado de metade da concentração inibitória máxima, que mede a eficácia de um composto na inibição de uma função biológica/bioquímica (HENDRIKS, 2010).

Em relação à classe química, os compostos (2'S,11bR)-variecolortin B e (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B são produtos naturais da classe dos alcaloides, mais especificamente enantiômeros espirocíclicos da dicetopiperazina. De acordo com a literatura, ambos compostos apresentam possíveis atividades de citotoxicidade contra farnesiltransferase (ZHONG et al., 2018). As espiroxinas A - E, da classe química das rifampicinas, já demonstraram atividade citotóxica, antibiótica e antitumoral frente à

carcinoma de ovário humano (MCDONALD et al., 1999). Suas estruturas policíclicas únicas e interessantes atividades biológicas as tornam alvos de síntese (SHU et al., 2021).

Um extenso número de inibidores da AChE já foram isolados de diferentes fontes naturais e dentre esses, os alcalóides são considerados os candidatos mais promissores para uso no tratamento da DA, devido à presença de nitrogênio nas suas estruturas (PEREIRA et al., 2010). De fato, um dos sítios de ligação da AChE envolve interação de um nitrogênio carregado positivamente com o respectivo ligante (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006).

Outro exemplo de inibidor da AChE derivado de fonte natural, temos a fisostigmina, usado para aliviar a manifestação de glaucoma e também no tratamento da DA (REALINI, 2011; RUSSO et al., 2013). Consiste em um carbamato de origem natural, podendo ser encontrado nas sementes da planta *Physostigma venosum*, conhecida como feijão-de-calabar (POHANKA, 2014). Interage no sítio ativo da enzima AChE humana com os seguintes resíduos: Gly-121 e Gly-122, Tyr-133 e Tyr-337, Phe-295 e Phe-297, His-446, mostrando similaridades com as moléculas estudadas (BARAK et al., 2009).

## 5 CONCLUSÃO

Atualmente, as técnicas de triagem virtual e *docking molecular* têm ocupado lugar de destaque quando se tratando da identificação de novas substâncias bioativas. O presente estudo analisou a estrutura de compostos naturais análogos em estrutura química para quatro antidepressivos amplamente utilizados no tratamento de quadros de depressão e ansiedade: escitalopram, sertralina, fluoxetina e vortioxetina, com objetivo de identificar novos inibidores da enzima AChE, visando o desenvolvimento de fármacos anti-alzheimer.

Inicialmente, foram encontrados um total de 3.628 compostos no banco de dados *PubChem*, 13 no banco de dados *Natural Products Atlas* e 19 no banco de dados *Drug Bank*. Devido ao elevado número de compostos disponíveis no banco de dados *PubChem*, a Regra dos Cinco de *Lipinski* foi aplicada como filtro, além da necessidade de existência da subestrutura no mercado, disponível para compra, objetivando a obtenção destas para ensaios de inibição enzimática.

Foi realizado o *docking molecular* para as 10 moléculas finais de acordo com os critérios fornecidos pela Regra de *Lipinski*, além de não apresentarem nenhuma toxicidade. Sua solubilidade e valores de  $DL_{50}$  também foram levados em consideração. Para cada uma das 10 moléculas, foram analisados seus enantiômeros R e S, juntamente ao inibidor galantamina. Os dados obtidos demonstraram a presença de quatro inibidores teóricos: (2'S, 11bR)-variecolortin B, (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E, (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B e (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B.

Todas as interações intermoleculares registradas pelo *docking molecular* ocorreram entre os compostos e resíduos já comprovados na literatura, tais como Trp-286, Phe-297 e Ser-293, presentes no sítio ativo da enzima AChE. No entanto, as interações variaram dentre os compostos, sendo que nenhum apresentou todas as interações descritas na literatura, nem mesmo o inibidor galantamina, utilizado ativamente no tratamento da DA. Essa discrepância pode ser explicada pela pouca elucidação que existe em se tratando do mecanismo de ligação enzima-substrato para cada uma das moléculas estudadas, além das diferenças estruturais dentre elas, favorecendo certas interações em detrimento de outras. Os inibidores teóricos apresentaram uma afinidade de ligação ao sítio da enzima levemente menor à do

inibidor de referência. Entretanto, todos os compostos exibiram propriedades físico-químicas favoráveis à biodisponibilidade oral.

O presente estudo provê informações primordiais para a otimização dos compostos (2'S, 11bR)-variecolortin B, (1aR,1bS,6aR,7aR,7bS,11aS)-spiroxin E, (2'R,5'Z,11bR)-variecolortin B e (1aR,1bS,6aS,7aR,7bS,11aS)-spiroxin B para atuarem como inibidores da enzima AChE. Por se tratar de um estudo *in silico*, é de suma importância que mais pesquisas e testes sejam feitos para avaliar o comportamento dos mesmos *in vitro* e, posteriormente, *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ACCELRY, S. I. **Discovery studio modeling environment**. Dassault Systèmes BIOVIA: San Diego, CA, USA, 2017.
- AHMED, Mushtaq *et al.* Comparative study of the inhibitory effect of antidepressants on cholinesterase activity in Bungarus sindanus (krait) venom, human serum and rat striatum. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 912-917, 2008. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14756360701809977>. Acesso em: 17 mar. 2022.
- ALZHEIMER, Alois. Uber eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **All Z Psychiatr**, v. 64, p. 146-148, 1907.
- BAO, Jie *et al.* New chromones from a marine-derived fungus, Arthrinium sp., and their biological activity. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1982, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/325564>. Acesso em: 5 jan. 2023.
- BARAK, Dov *et al.* Accommodation of physostigmine and its analogues by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 213-222, 2009. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/417/1/213/45098>. Acesso em: 18 set. 2021.
- BARTUS, Raymond T. *et al.* The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, n. 4558, p. 408-414, 1982. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.7046051>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- BLAKELY, Randy D. *et al.* Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 66-70, 1991. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/354066a0>. Acesso em: 24 mar. 2022.
- BLAKELY, Randy D.; DE FELICE, Louis J.; HARTZELL, Criss H. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. **The Journal of experimental biology**, v. 196, n. 1, p. 263-281, 1994. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jeb/article-abstract/196/1/263/7235>. Acesso em: 29 jun. 2022.
- BURNS, A. *et al.* The Effects of Donepezil in Alzheimer's Disease—Results from a Multinational Trial1. **Dementia and geriatric cognitive disorders**, v. 10, n. 3, p. 237-244, 1999. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/17126>. Acesso em: 11 nov. 2021.
- BURSULAYA, Badry D. *et al.* Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 17, p. 755-763, 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:JCAM.0000017496.76572.6f>. Acesso em: 11 dez. 2021.

BUTLER, Mark S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of natural products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np040106y>. Acesso em: 31 out. 2022.

BYMASTER, Frank P. *et al.* Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 160, p. 353-361, 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-001-0986-x>. Acesso em: 11 nov. 2022.

CARROLL, Anthony R. *et al.* Marine natural products. **Natural product reports**, v. 36, n. 1, p. 122-173, 2019. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/np/c8np00092a>. Acesso em: 14 set. 2022.

CAS SciFinder<sup>®</sup>. **CAS SciFinder Discovery Platform**, 2023. Disponível em: <https://www.cas.org/pt-br/solutions/cas-scifinder-discovery-platform/cas-scifinder>. Acesso em: 11 nov. 2022.

CHEN, Fenghua *et al.* The S-enantiomer of R, S-citalopram, increases inhibitor binding to the human serotonin transporter by an allosteric mechanism. Comparison with other serotonin transporter inhibitors. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 193-198, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X04001348>. Acesso em: 27 nov. 2022.

CHEUNG, Jonah *et al.* Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282-10286, 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm300871x>. Acesso em: 26 mar. 2022.

CIPRIANI, Andrea *et al.* Sertraline versus other antidepressive agents for depression. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2010. Disponível em: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD006117.pub3/abstract>. Acesso em: 17 mar. 2022.

CUMMINGS, Jeffrey L.; BACK, Carla. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 6, n. 2, p. S64-S78, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S106474811261063X>. Acesso em: 18 mar. 2022.

DA SILVA, Fernanda D.'Avila *et al.* Molecular docking and in vitro evaluation of a new hybrid molecule (JM-20) on cholinesterase activity from different sources. **Biochimie**, v. 168, p. 297-306, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908419303347>. Acesso em: 27 dez. 2022.

DRUGBANK. **DrugBank Online**. Disponível em: <https://go.drugbank.com/>. Acesso em: 17 nov. 2022.

EDDERSHAW, Peter J.; BERESFORD, Alan P.; BAYLISS, Martin K. ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. **Drug discovery today**, v. 5, n. 9, p. 409-414, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644600015403>. Acesso em: 27 fev. 2022.

EDINOFF, Amber N. *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse effects: a narrative review. **Neurology International**, v. 13, n. 3, p. 387-401, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2035-8377/13/3/38>. Acesso em: 20 set. 2022.

ENZ, Albert *et al.* Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. **Progress in brain research**, v. 98, p. 431-438, 1993. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308624292>. Acesso em: 19 set. 2021.

FITZGERALD, Paul J. *et al.* Repurposing cholinesterase inhibitors as antidepressants? dose and stress-sensitivity may be critical to opening possibilities. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, p. 620119, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2020.620119/full>. Acesso em: 19 set. 2022.

FRATIGLIONI, Laura; DE RONCHI, Diana; AGÜERO-TORRES, Hedda. Worldwide prevalence and incidence of dementia. **Drugs & aging**, v. 15, p. 365-375, 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165/00002512-199915050-00004>. Acesso em: 11 nov. 2022.

GERWICK, William H. **Plant sources of drugs and chemicals**. 2017.

GILLMAN, P. K. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 737-748, 2007. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/sj.bjp.0707253>. Acesso em: 11 nov. 2022.

GIMÉNEZ, B. G. *et al.* Evaluation of blockbuster drugs under the rule-of-five. **Pharmazie**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 148–152, 2010. Disponível em: Acesso em: 14 fev. 2023.

GORECKI, Lukas *et al.* SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. **Archives of toxicology**, v. 90, p. 2831-2859, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-016-1827-3>. Acesso em: 7 mar. 2022.

GOVENDER, Kamini; CHUTURGOON, Anil. An Overview of Repurposed Drugs for Potential COVID-19 Treatment. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1678, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11121678>. Acesso em: 15 dez. 2022.

GREENBERG, Paul E. *et al.* The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States (2005 and 2010). **The Journal of clinical psychiatry**, v. 76, n. 2, p. 5356, 2015. Disponível em:

<https://www.psychiatrist.com/jcp/delivery/economic-burden-adults-major-depressive-disorder-united/>. Acesso em: 22 nov. 2022.

GUAN, Longfei *et al.* ADMET-score—a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Medchemcomm**, v. 10, n. 1, p. 148-157, 2019. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/md/c8md00472b>. Acesso em: 13 nov. 2022.

HENDRIKS, Bart S. Functional pathway pharmacology: chemical tools, pathway knowledge and mechanistic model-based interpretation of experimental data. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 489–497, 2010. Disponível em: Acesso em: 15 fev. 2023.

HEYM, James; KOE, B. Kenneth. Pharmacology of sertraline: a review. **The Journal of Clinical Psychiatry**, 1988. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/1989-18348-001>. Acesso em: 19 jun. 2022.

HOUGHTON, Peter J.; REN, Yuhao; HOWES, Melanie-Jayne. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural product reports**, v. 23, n. 2, p. 181-199, 2006. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2006/np/b508966m>. Acesso em: 19 abr. 2022.

HUCKO, Ferdinand; JÄRV, Jaak; WEISE, Christoph. Substrate-binding sites in acetylcholinesterase. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 422-426, 1991. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016561479190621X>. Acesso em: 16 set. 2022.

HUNT, Reid; DE M. TAVEAU, René. On the physiological action of certain cholin derivatives and new methods for detecting cholin. **The British Medical Journal**, p. 1788-1791, 1906. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/20292507>. Acesso em: 17 out. 2022.

HWANG, Ji-Yeon *et al.* New peptides from the marine-derived fungi *Aspergillus allahabadii* and *Aspergillus ochraceopetaliformis*. **Marine drugs**, v. 17, n. 9, p. 488, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/519478>. Acesso em: 19 maio. 2022.

JAIN, Abhishek K. *et al.* Models and methods for in vitro toxicity. *In: In vitro toxicology*. Academic Press, 2018. p. 45-65. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128046678000031>. Acesso em: 18 maio. 2022.

JAMES, J. P. **Stewart Computational Chemistry**. MOPAC: Colorado Springs, CO, 2016.

JI, L. I.; LARREGIEU, Caroline A.; BENET, Leslie Z. Classification of natural products as sources of drugs according to the biopharmaceutics drug disposition classification system (BDDCS). **Chinese journal of natural medicines**, v. 14, n. 12, p. 888-897, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875536417300134>. Acesso em: 28 abr. 2022.

- KÁSA, Peter; RAKONCZAY, Zoltan; GULYA, Karoly. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Progress in neurobiology**, v. 52, n. 6, p. 511-535, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008297000282>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- KATZMAN, Robert. Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 43, n. 1, p. 13–20, 1993.
- KÖHLER, Stephan *et al.* The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 13-22, 2016. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0269881115609072>. Acesso em: 30 maio. 2022.
- KUMAR, Navneet *et al.* Drug repurposing for Alzheimer's disease: in silico and in vitro investigation of FDA-approved drugs as acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 7, p. 2878-2892, 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.2020.1844054>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- LAHIRI, Debomoy K. *et al.* Current drug targets for Alzheimer's disease treatment. **Drug development research**, v. 56, n. 3, p. 267-281, 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ddr.10081>. Acesso em: 11 abr. 2022.
- LAHLOU, Mouhssen. **The success of natural products in drug discovery**. 2013. Disponível em: [https://www.scirp.org/html/3-2500287\\_33502.htm](https://www.scirp.org/html/3-2500287_33502.htm). Acesso em: 19 fev. 2022.
- LAM, Raymond W. *et al.* Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) Clinical guidelines for the management of major depressive disorder adults. *In*: III. Pharmacotherapy. **Journal of affective disorders**, v. 117, p. S26-S43, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165032709003309>. Acesso em: 3 jan. 2023.
- LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X96004231>. Acesso em: 22 set. 2022.
- MARKEN, Patricia A.; MUNRO, J. Stuart. Selecting a selective serotonin reuptake inhibitor: clinically important distinguishing features. **Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry**, v. 2, n. 6, p. 205, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC181142/>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- MARTINEZ, Ana; CASTRO, Ana. Novel cholinesterase inhibitors as future effective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. **Expert opinion on investigational**

**drugs**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2006. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/13543784.15.1.1>. Acesso em: 11 out. 2021.

MATHUR, Sunil; HOSKINS, Clare. Drug development: Lessons from

nature. **Biomedical reports**, v. 6, n. 6, p. 612-614, 2017. Disponível em:

<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2017.909?text=fulltext>. Acesso em: 26 nov. 2022.

MCDONALD, Leonard A. *et al.* Spiroxins, DNA cleaving antitumor antibiotics from a marine-derived fungus. **Tetrahedron letters**, v. 40, n. 13, p. 2489-2492, 1999.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403999002427>. Acesso em: 21 abr. 2022.

MEYER, Jeffrey H. *et al.* Serotonin transporter occupancy of five selective serotonin reuptake inhibitors at different doses: an [11C] DASB positron emission tomography study. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 5, p. 826-835, 2004. Disponível em:

<https://ajp.psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/appi.ajp.161.5.826>. Acesso em: 18 fev. 2022.

MØRK, Arne *et al.* Pharmacological effects of Lu AA21004: a novel multimodal

compound for the treatment of major depressive disorder. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 3, p. 666-675, 2012. Disponível em:

<https://jpet.aspetjournals.org/content/340/3/666.short>. Acesso em: 11 out. 2022.

MORRIS, Garrett M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.21256>. Acesso em: 29 set. 2022.

MOSS, Donald E. Improving Anti-Neurodegenerative Benefits of

Acetylcholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease: Are Irreversible Inhibitors the Future? **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 10, 2020.

Disponível em: [/pmc/articles/PMC7279429/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37279429/). Acesso em: 14 fev. 2023.

MÜLLER, Tatiane C. *et al.* Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 1, p. 92-98, 2002. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443902000716>. Acesso em: 29 jul. 2022.

OBAID, Rami J. *et al.* Inhibitory potential of nitrogen, oxygen and sulfur containing heterocyclic scaffolds against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **RSC Advances**, [s. l.], v. 12, n. 31, p. 19764–19855, 2022. Disponível em:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/ra/d2ra03081k>. Acesso em: 15 fev. 2023.

PASCOLUTTI, Mauro; QUINN, Ronald J. Natural products as lead structures:

chemical transformations to create lead-like libraries. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 3, p. 215-221, 2014. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644613003802>. Acesso em: 13 ago. 2022.

PASTOOR, Devin; GOBBURU, Joga. Clinical pharmacology review of escitalopram for the treatment of depression. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 121-128, 2014. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425255.2014.863873>. Acesso em: 23 nov. 2022.

PEREIRA, David M. *et al.* Pharmacological effects of Catharanthus roseus root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 646-652, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711309002633>. Acesso em: 11 set. 2021.

PIRES, Douglas E. V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>. Acesso em: 15 mar. 2022.

pkCSM. Biosig Lab - University of Melbourne. **Pharmacokinetic properties**. Disponível em: <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>. Acesso em: 27 mar. 2022.

POHANKA, Miroslav. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 9809-9825, 2014. Disponível em: <https://www.mdpi.com/73392>. Acesso em: 17 jun. 2021.

PORTELIUS, Erik *et al.* An Alzheimer's disease-specific  $\beta$ -amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. **Neuroscience letters**, v. 409, n. 3, p. 215-219, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394006010068>. Acesso em: 10 set. 2021.

PROTEIN DATA BANK IN EUROPE. **Acetylcholinesterase: A gorgorous enzyme, [2022?]**. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/widgets/QuipStories/AChE/AChE.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2022.

PUBCHEM. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 11 nov. 2022.

REALINI, Tony. A history of glaucoma pharmacology. **Optometry and Vision Science**, v. 88, n. 1, p. 36-38, 2011. Disponível em: [https://journals.lww.com/optvissci/Fulltext/2011/01000/A\\_History\\_of\\_Glaucoma\\_Pharmacology.8.aspx](https://journals.lww.com/optvissci/Fulltext/2011/01000/A_History_of_Glaucoma_Pharmacology.8.aspx). Acesso em: 17 dez. 2022.

ROSENBERRY, Terrone L. *et al.* Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2098, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/241732>. Acesso em: 11 dez. 2021.

RUSSO, Patricia *et al.* Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 13, p. 1686-1693, 2013. Disponível em:

<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2013/00000020/00000013/art00008>. Acesso em: 20 jul. 2021.

SÁNCHEZ, Connie. The pharmacology of citalopram enantiomers: the antagonism by R-citalopram on the effect of S-citalopram. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 99, n. 2, p. 91-95, 2006. Disponível em:

[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-7843.2006.pto\\_295.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_295.x). Acesso em: 30 out. 2022.

SÁNCHEZ, Connie; KREILGAARD, Mads. R-citalopram inhibits functional and 5-HTP-evoked behavioural responses to the SSRI, escitalopram. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 2, p. 391-398, 2004. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305703003666>. Acesso em: 19 jul. 2022.

SANCHEZ, Connie; REINES, Elin H.; MONTGOMERY, Stuart A. A comparative review of escitalopram, paroxetine, and sertraline: Are they all alike?. **International clinical psychopharmacology**, v. 29, n. 4, p. 185, 2014. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047306/>. Acesso em: 16 set. 2022.

SANTARSIERI, Daniel; SCHWARTZ, Thomas L. Antidepressant efficacy and side-effect burden: a quick guide for clinicians. **Drugs in context**, v. 4, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4630974/>. Acesso em: 11 jan. 2023.

SCHUMACHER, Mark *et al.* Primary structure of Torpedo californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. **Nature**, v. 319, n. 6052, p. 407-409, 1986. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/319407a0>. Acesso em: 18 out. 2022.

SHU, Xin *et al.* Enantioselective Total Synthesis of (-)-Spiroxins A, C, and D. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 34, p. 18514-18518, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202105921>. Acesso em: 19 out. 2022.

SILMAN, Israel; SUSSMAN, Joel L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current opinion in pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293-302, 2005. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489205000445>. Acesso em: 11 out. 2021.

SMITH, Gwenn S. *et al.* Cholinergic modulation of the cerebral metabolic response to citalopram in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 132, n. 2, p. 392-401, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article-abstract/132/2/392/376512>. Acesso em: 27 set. 2022.

STEWART, James J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of**

**Molecular modeling**, v. 13, p. 1173-1213, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00894-007-0233-4>. Acesso em: 16 jul. 2022.

TAYLOR, Palmer; LAPPI, Shelley. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. Site and specificity of propidium binding. **Biochemistry**, v. 14, n. 9, p. 1989-1997, 1975. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00680a029>. Acesso em: 19 maio. 2022.

TORACK, Richard M. Historical overview of dementia. **The Pathologic Physiology of Dementia: With Indications for Diagnosis and Treatment**, p. 1-16, 1978. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-88437-5\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-88437-5_1). Acesso em: 11 nov. 2022.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.21334>. Acesso em: 17 ago. 2022.

VALECHA, Neena *et al.* Arterolane, a new synthetic trioxolane for treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: a phase II, multicenter, randomized, dose-finding clinical trial. **Clinical infectious diseases**, v. 51, n. 6, p. 684-691, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/51/6/684/460092>. Acesso em: 19 set. 2022.

VAN SANTEN, Jeffrey A. *et al.* The Natural Products Atlas 2.0: A Database of Microbially-Derived Natural Products. **Nucleic Acids Research**, 2021. Disponível em: <https://www.npatlas.org/>. Acesso em: 15 jun. 2022.

WANG, Wen-Liang *et al.* Three novel, structurally unique spirocyclic alkaloids from the halotolerant B-17 fungal strain of Aspergillus variegator. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 12, p. 2913-2919, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.200790240>. Acesso em: 19 abr. 2022.

XU, Yechun *et al.* Computational studies on acetylcholinesterases. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1324, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/215594>. Acesso em: 7 set. 2022.

YAMADA, Kiyofumi; NABESHIMA, Toshitaka. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. **Pharmacology & therapeutics**, v. 88, n. 2, p. 93-113, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725800000814>. Acesso em: 14 set. 2021.

YOURGENOME. **What is dementia?**. 2022. Disponível em: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-dementia/>. Acesso em: 20 out. 2022.

ZHANG, Yingkai; KUA, Jeremy; MCCAMMON, J. Andrew. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM

study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 35, p. 10572-10577, 2002. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja020243m>. Acesso em: 17 nov. 2022.

ZHONG, Wei-Mao *et al.* Eurotiumins A–E, five new alkaloids from the marine-derived fungus *Eurotium* sp. SCSIO F452. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p. 136, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/284810>. Acesso em: 20 out. 2022.

ZHONG, Weimao *et al.* Variecolortins A–C, three pairs of spirocyclic diketopiperazine enantiomers from the marine-derived fungus *Eurotium* sp. SCSIO F452. **Organic letters**, v. 20, n. 15, p. 4593-4596, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.orglett.8b01880>. Acesso em: 29 set. 2022.