



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO TECNOLÓGICO, DE
CIÊNCIAS EXATAS E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA, PROCESSOS E
MATERIAIS AVANÇADOS

Valkiria Machado

**Pirazolinas como potenciais agentes anti-alzheimer: DFT, acoplamento
molecular, inibição enzimática e estudos farmacocinéticos**

Blumenau
2023

Valkiria Machado

Pirazolinas como potenciais agentes anti-alzheimer: DFT, acoplamento molecular, inibição enzimática e estudos farmacocinéticos

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.
Orientador: Prof. Dr. Aldo Sena de Oliveira

Blumenau
2023

Ficha de identificação elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Valkiria

Pirazolinas como potenciais agentes anti-alzheimer: DFT, acoplamento molecular, inibição enzimática e estudos farmacocinéticos / Valkiria Machado ; orientador, Aldo Senna de Oliveira, 2023.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau, Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados, Blumenau, 2023.

Inclui referências.

1. Nanociência, Processos e Materiais Avançados. I. Senna de Oliveira, Aldo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados. III. Título.

Valkiria Machado

**Pirazolinas como potenciais agentes anti-alzheimer: DFT, acoplamento molecular,
inibição enzimática e estudos farmacocinéticos**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra Patrícia Bulegon Brondani
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra Lidiane Meier
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Alfredo Alberto Muxel
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de mestre em Nanociência, Processos e Materiais
Avançados.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Aldo Sena de Oliveira Orientador

Blumenau, 2023

Este trabalho é dedicado à Deus, aos meus queridos Pais, e ao meus cachorros que me acompanham nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, pelas oportunidades, perseverança, alegria e força de viver;

Aos meus pais, pelo amor infinito e incansável presença ao meu lado; principalmente minha mãe Gicéla por sempre ter me apoiado e me impulsionado a estudar, e buscar o crescimento através do estudo.

Aos meus cachorros Laurinha e Yuri, por serem companheiros e me encherem de carinho e energia para continuar a desenvolver o trabalho.

Aos meus irmãos Ariane Machado e Luiz Afonso Faccim Machado, o qual são meus parceiros de vida.

Aos meus sobrinhos João Vitor e Davi que mesmo longe são meus tesouros.

Ao meu orientador Prof Dr Aldo Sena de Oliveira, por confiar em mim, e me proporcionar a oportunidade de desenvolver este trabalho do seu lado, e me ajudar com todo suporte necessário.

Aos meus colegas de pesquisa e de curso.

A UFSC e ao PPGNPMat, pela estrutura, oportunidade e possibilidade de aprendizado.

Muito obrigada.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, caracterizada pela perda de memória de forma irreversível e progressiva, que acarreta diminuição do desempenho das tarefas diárias e reduz a fala, habilidades e percepção visual, culminando em demência total. No Brasil, a prevalência de demência varia de 1,6%, entre as pessoas com idade entre 65 a 69 anos e 38,9%, naqueles com mais de 84 anos. A maior parte dos medicamentos disponíveis para o tratamento de DA são inibidores da acetilcolinesterase (AChE), o que faz com que essa enzima seja um alvo molecular validado. Já que os atuais medicamentos para o tratamento da DA apresentam efeitos adversos em demasia, torna-se urgente a busca por novos fármacos. Neste contexto, investigou-se o perfil anticolinesterásico de uma série de 18 pirazolininas as quais apresentaram efeitos inibitórios contra a AChE com valores de IC_{50} variando entre 0,052 e 1,947 μ M. Investigações *in vitro* da inibição da AChE mostraram alta correlação com estudos de docagem molecular, especialmente para a função de pontuação ChemPLP ($r^2= 0,9901$). Foram aplicados estudos DFT, que mostraram uma correlação entre os resultados da inibição enzimática e a energia do orbital HOMO-1, que são consistentes com os dados da literatura. Adicionalmente, foram investigadas as propriedades físico-químicas, o perfil ADMET e a permeabilidade de membrana (PAMPA) das pirazolininas. Os resultados encorajam o uso do composto **2b** (1-(5-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(2-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona) em estudos moleculares de otimização que podem resultar em compostos promissores no desenvolvimento de fármacos com propriedades anticolinesterásicas que possam ser utilizadas no tratamento da DA.

Palavras-chave: Alzheimer, pirazolininas. Acetilcolinesterase, docagem molecular, DFT.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, characterized by irreversible and progressive memory loss, which leads to decreased performance of daily tasks and reduces speech, skills, and visual perception, culminating in total dementia. In Brazil, in the elderly, the prevalence of dementia varies from 1.6% among people aged 65 to 69 years and 38.9% among those over 84 years of age. Most of the drugs available for the treatment of AD are acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, which makes this enzyme a validated molecular target. Since the current drugs for the treatment of AD have too many adverse effects, the search for new drugs becomes urgent. In this context, we report the investigation of the anticholinesterase profile of a series of 18 pyrazolins which showed inhibitory effects against AChE with IC₅₀ values ranging from 0.052 to 1.947 μ M. *In vitro* investigations of AChE inhibition showed a high correlation with molecular docking studies, especially for the ChemPLP scoring function ($r^2= 0.9901$). DFT studies were applied, which showed a correlation between the results of enzymatic inhibition and the energy of the HOMO-1 orbital, which are consistent with the literature data. Additionally, the physicochemical properties, ADMET profile, and membrane permeability (PAMPA) of pyrazolins were investigated. The results encourage the use of the compound 2b (1-(5-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-(2-nitrophenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl) ethanone) in molecular optimization studies that may result in promising compounds in the development of drugs with anticholinesterase properties that can be used in the treatment of AD.

Keywords: Alzheimer's disease, pyrazolines. Acetylcholinesterase, molecular docking, DFT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte transversal pela metade entre os ouvidos.....	4
Figura 2: Formação de oligômeros de proteínas β amilóides (1), agregação dos oligômeros (2) e formação de placas amilóides com perda da capacidade de realizar sinapses (3)	6
Figura 3: Células com DA apresentando acúmulo de placas visto sob microscópio...	7
Figura 4: Monômero da acetilcolinesterase: uma proteína alfa/beta que contém 537 aminoácidos e consiste de uma mistura de 12 folhas beta envolvidas por 14 alfa-hélices.....	9
Figura 5: Transmissão do impulso pela sinapse colinérgica.....	10
Figura 6: Estruturas 2D dos inibidores da AChE, desenhados no programa chemdraw.....	12
Figura 7: Etapas envolvidas no desenvolvimento de um fármaco.....	17
Figura 8: Estrutura geral das pirazolinas.....	19
Figura 9: Página principal do SwissADME. Fonte: site SwissADME.....	32
Figura 10: Sobreposições de resultados de cálculo de acoplamento molecular para o ligante co-cristalizado (1YL604). A figura foi criada utilizando o Programa PyMol.....	36
Figura 11: Correlação entre os resultados experimentais (IC50) e computacionais (Pontuação). Gráfico obtido através do programa Origem.....	37
Figura 12: Diagrama 2D da interação entre o co-fator (1YL604) e a cavidade enzimática da proteína 4M0E. Diagrama obtido através do programa Maestro.....	38
Figura 13: Interações intermoleculares do composto 1b na cavidade enzimática da enzima AChE. A figura foi preparada usando o PyMol.....	39
Figura 14: Interações intermoleculares do composto 2b na cavidade enzimática da enzima AChE. A figura foi preparada usando PyMol.....	39
Figura 15: Densidade de Kernel de propriedades número de átomos pesados aromáticos e número de átomos pesados.....	42
Figura 16. Superfície HOMO-1 e energias para 1a-1i. Aqua representa contribuições positivas e fúcsia representa contribuições negativas.....	44
Figura 17: Superfície HOMO-1 e energias para 2a-2i. Aqua representa contribuições positivas e fúcsia representa contribuições negativas.....	45
Figura 18: Síntese de chalconas intermediários e pirazolinas 1a-i e 2a-i. Reagentes e condições: (i) etanol, hidróxido de sódio, r.t.; (ii) hidrazina, ácido acético, refluxo	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dosagens usuais.....	14
Tabela 2: Estrutura química das pirazolinas (1a-i e 2a-i).....	34
Tabela 3: Comparação entre os valores de IC50 dos compostos relacionados com a inibição da AChE e as respectivas pontuações obtidas através da função de pontuação ChemPLP.....	35
Tabela 4: Primeiro conjunto de propriedades físico-químicas das pirazolinas (1a-1i e 2a-2i) e dos medicamentos anticolinesterasicos.....	41
Tabela 5: Segundo conjunto de propriedades físico químicas das pirazolinas (1a-1i e 2a-2i) e dos medicamentos anticolinesterásicos.....	43
Tabela 6: Permeabilidade aparente (Papp) e retenção de membrana (MR) de pirazolinas (1a-i e 2a-i) em uma membrana artificial paralela modelode permeabilidade do ensaio de permeabilidade-gastrointestinal do trato.....	46
Tabela 7: Parâmetros farmacocinéticos para 2b e donepezila.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
APPP	Proteína precursora amiloide
BBB	Barreira Hematoencefálica
BuChE	Butirilcolinesterase
BHE	Barreira hematoencefálica
CAS	Sítio ativo catalítico
CADD	Computer-Aided Drug
CAE	Camada de água Estacionária
Ch	Colina
DA	Doença de Alzheimer
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GOLD	<i>Genetic Optimization for Ligand Docking</i>
hAChE	Acetilcolinesterase humana
iAChE	Inibidores da acetilcolinesterase
LBDD	<i>Ligand-Based Drug Design</i> (planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante)
LogP	Grau de lipofilicidade
MIF	Campos de interação molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
nAChRs	Receptores nicotínicos da ACh
mAChRs	Receptores muscarínicos da ACh
PAMPA	Permeabilidade Em Membrana Artificial Paralela
PAS	<i>Peripheral Anionic Site</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
PPA	Proteína Precursora de Amilóide
PSA	Polar Surface Area
QSAR	Relação quantitativa de estrutura-atividade
RCSB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de prótons
RNA	Ácido ribonucleico

SBDD *Structure-Based Drug Design* (planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor)

SNC Sistema nervoso central PAS: Sítio aniônico periférico

TGI Trato gastro intestinal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS.....	3
1.1.1	Objetivo geral.....	3
1.1.2	Objetivos específicos.....	3
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1	DOENÇA DE ALZHEIMER ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	3
2.2	ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS.....	5
2.3	ACETILCOLINESTERASE COMO ALVO PARA O PLANEJAMENTO DE POTENCIAS FÁRMACOS.....	8
2.4	TRATAMENTO FÁRMACOLOGICO.....	11
2.5	O PAPEL DA QUÍMICA MEDICINAL NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS.....	15
2.5.1	Pirazolinas.....	18
2.6	QUÍMIO INFORMÁTICA.....	20
2.6.1	Estratégias comentes utilizadas em químio informática (<i>SBDD E LBDD</i>)	20
2.6.2	Química Quântica.....	23
2.6.3	Teoria do Funcional da Densidade (DFT).....	24
2.7	METABOLISMO DOS FÁRMACOS.....	26
2.8	REGRA DE LINPISKI.....	28
2.9	MODELOS DE AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL DOS FÁRMACOS.....	29
2.10	INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICO.....	30
2.11	PERMEABILIDADE EM MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA).....	33
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
3.1	SÍNTESE.....	33
3.2	EFEITO INIBIDOR DAS PIRAZOLINAS E ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE.....	34
4	MATERIAS E MÉTODOS	50
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PIRAZOLINAS 1A-I E 2A-I.....	50

4.2	ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE.....	52
4.3	ENSAIO DE PERMEABILIDADE ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA).....	52
4.4	ESTUDOS COMPUTACIONAIS.....	53
4.4.1	DocagemMolecular.....	53
4.4.2	Estudos Quânticos.....	54
4.4.3	Densidade de Kernel.....	54
4.4.4	Previsão <i>in silico</i> do perfil farmacocinético.....	54
4.5	Análise estatística.....	55
5	PERSPECTIVA FUTURAS.....	55
6	CONCLUSÃO.....	55
7	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita em 1906 pelo psiquiatra alemão, Alois Alzheimer, que passou a estudar o cérebro de uma paciente, onde então observou a presença de placas amiloides e uma perda maciça de neurônios enquanto examinava-o. Este paciente apresentava sintomas de perda de memória e mudança de personalidade antes de morrer. Alois descreveu a condição como uma doença grave do córtex cerebral. Emil Kraepelin chamou essa condição médica de doença de Alzheimer pela primeira vez na 8ª edição do manual de psiquiatria (BREIJYEH, 2020).

De acordo com Inouye, Pedrazzani e Pavarini (2010), a DA é um tipo de demência, de declínio cognitivo crescente e irreversível, com múltiplos déficits cognitivos, dos quais um, obrigatoriamente, é a perda de memória. Esses sintomas são suficientemente intensos para causar impacto nas atividades diárias de uma pessoa (ÁLVAREZ et al., 2020).

A DA tem uma prevalência estimada de 10 a 30% na população acima de 65 anos de idade, e a maioria dos pacientes (<95%), tem a forma esporádica, que é caracterizada por um início tardio, entre 80 e 90 anos de idade (HAYDEN et al., 2013). É representada por respostas cognitivas desadaptadas, devido a seu comprometimento cerebral extenso (LUZARDO; GORINI; SILVA, 2006; ARAÚJO; NICOLI; 2010; FERREIRA; 2011).

De uma perspectiva histológica, existem placas amilóides no espaço extracelular, especialmente ao redor das conexões neuronais e nas paredes dos vasos sanguíneos, relacionadas a processos inflamatórios e disfunções neuronais. Há também mudanças nas células nervosas, como os emaranhados neurofibrilares, que se relacionam com mudanças nos dendritos e axônios (CHEN, X.Q, MOBLEY, W.C; 2019).

A fisiopatologia ainda não é totalmente compreendida, pois é caracterizada como uma doença multifatorial e altamente complexa. No cérebro de pacientes com DA, há aspectos histopatológicos, como as fibrilhas amilóides, que não são mais do que depósitos fibrilares nas paredes dos vasos sanguíneos, que levam à formação de emaranhados neurofibrilares, danos neuronais e sinápticos, glial ativação e o processo inflamatório (KNOPMAN, D.S; AMIEVA, H; PETERSEN, R.C; 2021).

Atualmente, onde a maior parte dos fármacos disponíveis para o tratamento da DA, e que atuam na enzima acetilcolinesterase, apresentam muitos efeitos adversos,

torna-se mais difícil a adesão e conseqüentemente o tratamento dos pacientes. Sendo assim, o desenvolvimento de novos fármacos que apresentam menos efeitos adversos ou até mesmo que apresente a cura para esta enfermidade que afeta uma grande parte da população mundial, é considerado de extrema urgência.

No cenário atual, os fármacos anticolinesterásicos, cujo mecanismo de ação é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), são os mais utilizados, podendo potencializar a função colinérgica, induzindo a melhoria do perfil cognitivo e de alguns efeitos comportamentais da DA. (ARAUJO C; SANTOS, V; GONSALVES, A; 2016). Entretanto apresentam diversos efeitos adversos.

O crescente impacto da DA, juntamente com os poucos agentes terapêuticos seguros disponíveis, determinou um grande esforço para descobrir novos medicamentos inibidores de AChE. Devido a suas diversas atividades biológicas, as pirazolininas têm atraído um interesse crescente no campo de química medicinal. Sua atividade antioxidante (RAUT, D. LAWAND, A.S. KADU, V.D et al.; 2021), antiinflamatória (ABDELLATIF. K; ELSHEMY. H; AZOZZ. A; 2015), antimicrobiana (HARIKRISHNA. N et.al.; 2016; NISA. S, YUSUF. M; 2020), antituberculose (HARIKRISHNA. N et.al., 2016), antibacteriana (KHAN S. A.,et.al.; 2014; & VIVEKA S, et.al.; 2015), e propriedades antitumorais (NEPALI K, KADIAN K; OJHA R, et al., 2012 & NAAWAZ F; ALAM O; PERWEZ A et.al., 2020) são devidas à presença de um anel heterocíclico e sua variedade estrutural (CHOUITER M; BOULEBD H;PEREIRA D; et.al., 2020).

Portanto, neste trabalho é apresentado o planejamento e execução de testes biológicos para verificar a potencialidade das pirazolininas em atuar na inibição da AChE, para as quais futuras modificações estruturais possam levar ao desenvolvimento de novos agentes úteis no tratamento da DA.

1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito anticolinesterásico de dezoito pirazolinas, através da combinação de experimentos *in vitro* e *in silico*.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Planejar e sintetizar dezoito pirazolinas;
- ✚ Avaliar a habilidade de inibição das dezoito pirazolinas frente à AchE *in vitro*;
- ✚ Desenvolver estudos de docagem molecular para investigar as principais interações entre as pirazolinas e o sítio da AChE;
- ✚ Analisar as propriedades ADMET das dezoito pirazolinas (*in vitro* e *in silico*);
- ✚ Analisar a teoria funcional de densidade para investigar os orbitais envolvidos na ação anticolinesterásica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é o tipo mais comum de demência. A demência é um nome coletivo para síndromes cerebrais degenerativas progressivas que afetam a memória, o pensamento, o comportamento e as emoções (JORDAN, P.S. 2019).

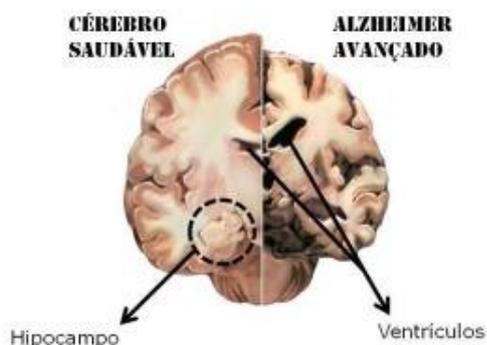
Atualmente, é evidenciado o aumento do número de idosos, como resultado da diminuição da taxa de natalidade e o aumento da expectativa de vida. Estimativas revelam que em 2025 haverá no mundo 1,2 bilhões de idosos e, no Brasil, 32 milhões. Neste contexto, as doenças crônico-degenerativas configuram-se como um crescente desafio, visto sua elevada prevalência nessa parcela da população (SILVA, et al., 2020).

A DA de início precoce acomete cerca de 5% dos pacientes e é caracterizada pela apresentação dos sintomas antes dos 65 anos. A expectativa de vida média do paciente com DA aproxima-se de 10 a 12 anos após o começo dos sintomas (MOREIRA; MOREIRA, 2020).

No ano de 2016, a DA correspondia em média à 70% dos casos de demência padronizada por idade no Brasil, sendo a segunda maior prevalência no mundo. A proporção de pessoas com DA no Brasil aumentou 127% desde 1990. Estudos indicam que a probabilidade de diagnóstico médico de DA aumenta 11% para cada ano aumentado com o envelhecimento. Com o aumento da longevidade, a prevalência de DA também tende a aumentar. De 2007 a 2017, as mortes por demência no Brasil cresceram 55%, sendo uma taxa maior que as mortes por câncer de mama, próstata e fígado juntas (FETER, et al., 2021). Como ocorre enorme perda de células, há alteração de todo o cérebro na DA em estágio avançado.

Na Figura 1 é possível observar o encolhimento do córtex, e então as regiões envolvidas com os pensamentos e memórias se danificam. Este encolhimento ocorre principalmente no hipocampo, região do córtex que exerce papel fundamental na formação de novas lembranças. Os ventrículos (espaços preenchidos por fluido dentro do cérebro) ficam maiores.

Figura 1. Comparação entre o corte transversal pela metade entre os ouvidos.



Fonte: Alzheimer's Association, 2023.

A DA está aliada com certo número de fatores, incluindo grande falha dos neurônios colinérgicos em várias partes do cérebro que destroem gradualmente habilidades de pensamentos, memória e, finalmente, até a capacidade de realizar atividades básicas do dia. Geralmente, o diagnóstico da doença de Alzheimer é semelhante ao diagnóstico de outras demências. Entretanto, apesar das características clínicas, laboratoriais e específicas das imagens, o diagnóstico

definitivo da DA só pode ser confirmado pela avaliação histológica do tecido encefálico (HUANG. J; 2019).

Diante do exposto o diagnóstico recente da DA é um campo de pesquisa emergente, embora ainda não exista a cura da doença, com a existência de fármacos anti - Alzheimer, que apenas tratam os sintomas (AMBURE, P; KAR, S; ROY, K. 2014).

2.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

Conhecer os aspectos fisiopatológicos da DA é de grande importância para entender os mecanismos de atuação da doença no cérebro do paciente. O declínio neuronal progressivo é decorrente da apoptose e perdas sinápticas, sendo a principal causa de perda do volume cerebral na DA. A principal região cerebral afetada são as células piramidais da lâmina II do córtex entorrinal e suas conexões com a região CA1 do hipocampo. Essas áreas estão ligadas à memória e cognição, por isso que, quando comprometidas, o paciente tem perda progressiva de memória e falhas cognitivas. Porém, para explicar essas características são levantadas duas hipóteses: a formação de emaranhados neurofibrilares e placas amiloides no cérebro (CAVALCANTI et al., 2012).

As características histopatológicas presentes no parênquima cerebral de pacientes portadores da DA incluem depósitos fibrilares amiloides localizados nas paredes dos vasos sanguíneos, associados a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, acúmulo de filamentos anormais da proteína tau e consequente formação de novelos neurofibrilares (NFT), perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação (SELKOE, D. 2001).

Ao se investigar os marcadores inflamatórios capazes de apontar as mudanças fisiológicas neurocognitivas em idosos, foi apontado a possibilidade de marcadores como o MIP-1 β e A β 42, dosados no plasma e líquido cefalorraquidiano, como sendo capazes de oferecer informações sobre o grau inflamatório da DA (MOREIRA, MOREIRA, 2020).

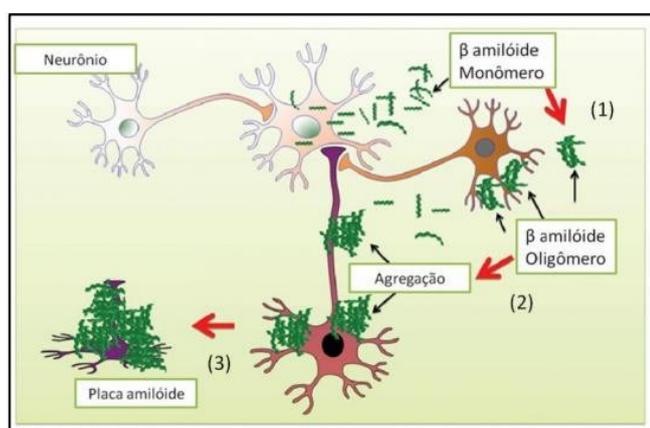
A proteína β -amilóide de 42 aminoácidos tem um papel crítico na patogênese da DA de acordo com as evidências, que intitulam esta etiologia como a “hipótese da cascata amilóide”. Os agregados de A β 42 são responsáveis pela formação de placas senis, que podem ocasionar a formação de uma cascata neurotóxica que termina com as manifestações clínicas da DA. Desta forma uma estratégia plausível é de inibir a

produção de β -amilóide, podendo ser uma estratégia para combater a DA (MOUSSA-PACHA et al., 2019).

O acúmulo de proteína BA promove a sua precipitação e agregação em forma de placas que promovem um processo inflamatório e/ou oxidativo que leva a perda da função neuronal (CARMELLI, 2000). O termo oligômero caracteriza um amplo grupo de agregados não-fibrilares. As estruturas dos oligômeros e a formação das fibrilas são consideravelmente dependentes do ambiente celular. Por exemplo, protofibrilas são instáveis em solução, mas podem ser estabilizadas por superfícies. Superfícies hidrofóbicas promovem a agregação de estruturas amorfas, e superfícies carregadas promovem a formação fibrilar (BURKE, K.A; YATES, E. A; LEGLEITER, J; 2013).

A agregação de monômeros (Figura 2) é passível de ocorrer por meio de diferentes caminhos. Inicialmente, pode haver a dimerização do peptídeo formando oligômeros fibrilares que se polimerizam e em seguida formam fibrilas amiloides maduras. O mesmo dímero pode formar oligômeros pré-fibrilares, gerando em seguida protofibrilas que podem sofrer uma mudança conformacional em bloco para formar fibrilas amiloides (LEE, J; et. Al., 2001), formando pequenos oligômeros e, eventualmente, levando à formação de agregados maiores (HANE, F; et. Al., 2013) Os oligômeros e as protofibrilas aparentam ser os estados de aglomeração de maior toxicidade (KAYED, R; et. al., 2004).

Figura 2. Formação de oligômeros de proteínas β amilóides (1), agregação dos oligômeros (2) e formação de placas amilóides com perda da capacidade de realizar sinapses (3).



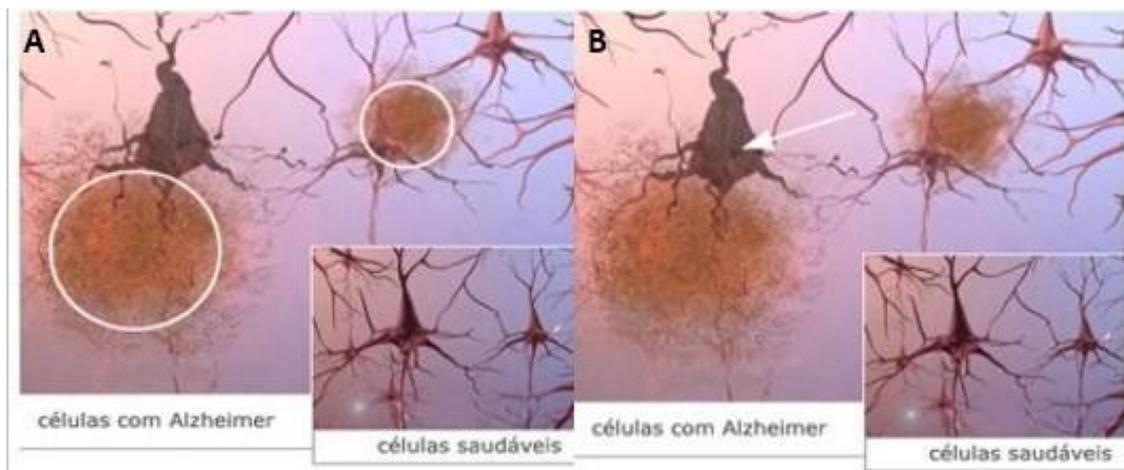
Fonte: Kung, 2012.

Estudos *in vitro* demonstraram que estes oligômeros exercem uma forte ação inibitória sobre a potenciação de longa duração, um fenômeno de melhoria duradoura na transmissão do sinal entre dois neurônios, que contribui para a plasticidade sináptica (WALSH, D. et. al., 2002).

Já a proteína tau é uma fosfoproteína que é produzida por splicing alternativo de RNA mensageiro (mRNA) de um único gene que reside no cromossomo 17. Nos neurônios, a tau tem o papel de ligar e estabilizar os microtúbulos e pode regular o transporte axonal, funções que são reguladas por eventos de fosforilação específicos do local (KAIHONG, 2006).

A formação de emaranhados neurofibrilares é uma lesão característica da DA. Os emaranhados neurofibrilares são formados pela hiperfosforilação da proteína tau que está associada ao microtúbulo do axônio celular (CAVALCANTI et al., 2012). Na Figura 3 podem ser vistos os efeitos da DA, pela análise o tecido cerebral com o microscópio. Na figura 3A, há placas e depósitos anormais de fragmentos de proteína, se agrupam entre as células nervosas. Na figura 3B, evidencia-se as células nervosas mortas e prestes a morrer com emaranhados neurofibrilares, que são formados por filamentos torcidos de outra proteína.

Figura 3. Células com DA apresentando acúmulo de placas visto sob microscópio.



Fonte: Alzheimer's Association, 2023.

Depois que as células que carregam o emaranhado morrem, os filamentos de tau podem permanecer no espaço extracelular como os chamados emaranhados

fantasmas, consistindo em grande parte na região de repetição de tau. Portanto, não é de surpreender que a formação de agregados de tau seja deletéria, e as experiências mostraram que os agregados feitos da região de repetição de tau podem induzir neurotoxicidade (SPILLANTINI et al., 2013).

Estudos recentes indicam a possibilidade dos neutrófilos estarem implicados no processo de neuroinflamação, com diapedese para o endotélio vascular e parênquima cerebral solidificado em pesquisas moleculares e bioquímicas (RODRIGUES, et al., 2019).

Em pesquisas recentes foi descoberto também, que a estratégia imunológica de armadilha em redes extracelulares de neutrófilos (NETs), existente em processos autoimunes inflamatórios, é um importante agente do processo neuro inflamatório das doenças neurodegenerativas, principalmente para DA e seu desenvolvimento (MOREIRA, MOREIRA, 2020).

Vários estudos têm apresentado consideráveis fatores ligados à neuro inflamação como contribuintes para a compreensão do acometimento neurológico causado pela DA, particularmente o estresse oxidativo, respostas inflamatórias por parte de neutrófilos e da micróglia, alterações vasculares e da BHE (RODRIGUES, et al., 2019)

Diversas linhas de evidências sugerem que déficits colinérgicos podem contribuir para a fisiopatologia da DA. Um déficit na neurotransmissão colinérgica foi estabelecido como uma característica central na fisiopatologia da doença. Assim, a inibição da AChE é a estratégia mais bem sucedida para os atuais tratamentos sintomáticos para a DA (AGO, Y. et al., 2011).

2.3 ACETILCOLINESTERASE COMO ALVO PARA PLANEJAMENTO DE POTENCIAS FÁRMACOS PARA A DA

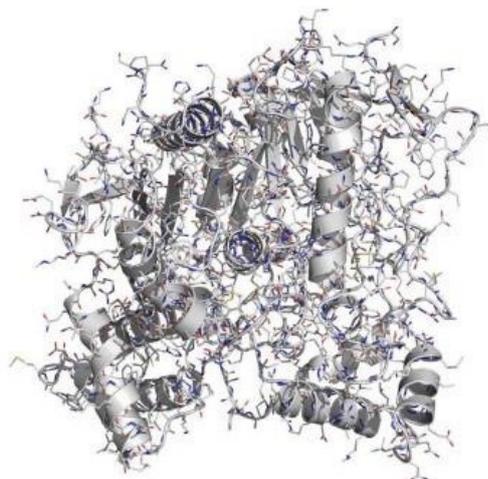
A AChE pode ser classificada de diversas maneiras. É uma serina hidrolase, seu sítio catalítico contém uma tríade catalítica serina, histidina e um resíduo ácido assim como os sítios catalíticos das serina proteases, como a tripsina. No entanto, o grupo ácido na AChE é um glutamato enquanto que, na maioria dos outros casos, corresponde a um resíduo de aspartato (SOREQ, H; SEIDMAN, S. 2001).

A primeira estrutura tridimensional (3D) da AchE, determinada em 1991, é de Torpedo californica (SUSSMAN et al., 1991) e, desde então, muitas outras estruturas

3D de AChE livre ou em complexo com diversos inibidores, a partir de diferentes espécies, foram determinados e depositados no banco de dados PDB (do inglês, Protein Data Bank) do RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics).

A determinação da estrutura cristalográfica da AChE de *Torpedo californica* permitiu a primeira visualização de uma resolução atômica de cavidade de ligação para a acetilcolina. As várias formas oligoméricas de AChE de órgãos elétricos de peixes elétricos, *Electrophorus electricus* e *Torpedo californica*, são estruturalmente similares à aquelas em nervos e músculos de vertebrados (DVIR, H. et al., 2010).

Figura 4. Monômero da acetilcolinesterase: uma proteína alfa/beta que contém 537 aminoácidos e consiste de uma mistura de 12 folhas beta envolvidas por 14 alfa-hélices.



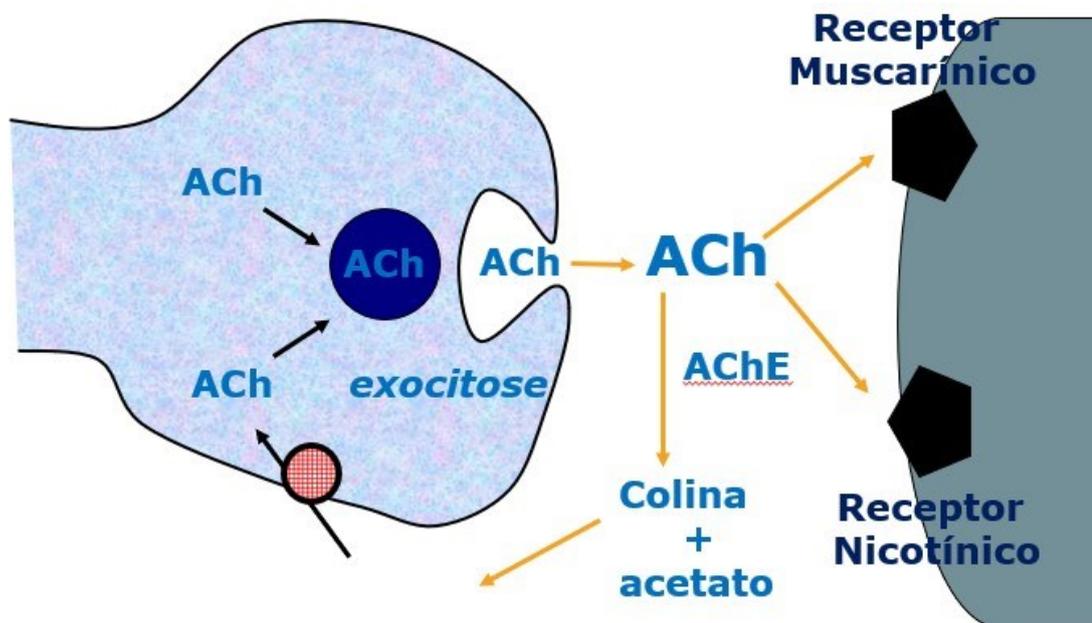
Fonte: Almeida, 2014.

A AChE é uma enzima que interrompe sua neurotransmissão no sistema nervoso colinérgico através da fenda neurosináptica ou na junção neuromuscular. De um ponto de vista toxicológico, pesticidas e agentes nervosos são, provavelmente, os compostos mais tóxicos que inibem a atividade dessa enzima. Portanto, o sistema nervoso colinérgico é um alvo de muitos compostos sendo importante devido a sua significativa farmacologia ou toxicologia (POHANKA, M. et al., 2012).

Um estímulo elétrico faz com que a Ach a seja armazenada em vesículas (Figura 5) sendo enviada para fenda sináptica e, reversivelmente, ser depositada no receptor específico, isso produz outro estímulo elétrico no órgão efetor (nervo, músculo ou glândula). Para prevenir o estímulo contínuo, a acetilcolina é hidrolisada pela enzima AChE em acetato e colina. Como resultado, a acetilcolina é incapaz de

estimular o receptor adicional e é reabsorvida na terminação nervosa. A ACh nova é então sintetizada e novamente é guardada nas vesículas para uso posterior.

Figura 5. Transmissão do impulso pela sinapse colinérgica.



Fonte: Elaborado pela autora.

A função da AChE é catalisar rapidamente e com eficiência a hidrólise da acetilcolina ACh nas sinapses colinérgicas para acetato e colina como visto na figura 5. A rápida hidrólise da acetilcolina desativa o neurotransmissor após sua ligação ao receptor, de modo a impedir seu acúmulo nas sinapses e evitar a produção de estímulos contínuos por interações repetitivas. A hipótese colinérgica postula que uma disfunção na acetilcolina contribui substancialmente, para o declínio cognitivo observado na DA. Isso é baseado na observação de que a transmissão colinérgica tem papel fundamental na cognição e é interrompido em pacientes com a DA. A ACh é um neurotransmissor chave envolvido na aprendizagem e na memória que se liga a subtipos de receptores muscarínicos da ACh (mAChRs).

A neurotransmissão nicotínica está implicada na patogênese da DA. Evidências adicionais sugerem que os principais subtipos de mAChR envolvidos na DA são mAChRs M1 pós-sinápticos que medeiam os efeitos da ACh e os mAChRs M2 pré-sinápticos que inibem a liberação da ACh.

A deposição de placas amilóides pode contribuir para a disfunção colinérgica na DA diminuindo a liberação da ACh pré-sináptica prejudicando o acoplamento do

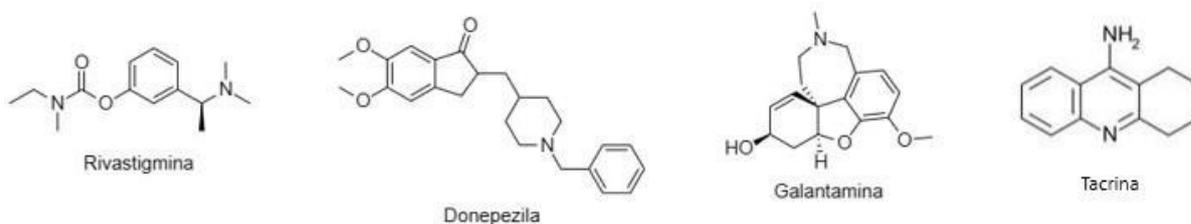
mAChRs M1 pós-sináptico com as proteínas G. Isso leva a diminuição do sinal da transdução de sinal, deficiências na cognição, uma redução nos níveis da proteína precursora amiloide (APP), a geração de mais B-amiloide neuro tóxica e uma redução ainda maior na liberação de ACh (THATHIAH, A; DE STROOPER, B. 2011).

Estudos envolvendo a AChE provaram ser o alvo terapêutico mais viável para melhora sintomática na DA, pois o déficit colinérgico é uma descoberta recente e consistente nesta doença (MEHTA, M; ADEM, A; SABBAGH, M. 2012). A DA tem sido associado a vários fatores tais como o estresse oxidativo, distúrbios neuroinflamatórios, anormalidades mitocondriais, enovelamento incorreto da proteína e agregação. A baixa atividade colinérgica em pacientes com DA conduziu a uma hipótese conhecida como a hipótese colinérgica. Esta hipótese afirma que a doença é associada com a disfunção colinérgica que causa a perda da memória (REMYA, C. et al., 2012).

2.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

O tratamento farmacológico disponível hoje para a população são os inibidores AChE, sendo os mais utilizados a rivastigmina (Exelon®) e donepezil (Aricept®) (Figura 6). Os inibidores da AChE não revertem o quadro clínico do paciente, mas ajudam a prevenir o progresso da doença. Portanto estes compostos inibidores da AChE representam uma proposta para o tratamento da DA desde a sua correlação com a enzima e a formação do peptídeo β - amiloide (BAZZINI, P.; WERMUTH, C. G., 2008).

Figura 6. Estruturas 2D dos inibidores da AChE.



FONTE: Elaborado pela autora.

Em 1991 foi descrita pela primeira vez a Hipótese da Cascata Amiloide, que, depois de algumas adequações, defende que a neurodegeneração na DA começa com a clivagem da proteína precursora de amiloide (PPA), que ocasiona acúmulo, agregação e depósito de diversas formas tóxicas da substância beta-amiloide, causando distrofia do citoesqueleto neuronal, pela agregação de metais tóxicos e ativação da micróglia, o que libera radicais livres responsáveis pela oxidação de substâncias importantes para o metabolismo celular (SANT'ANA, 2018).

Dessa forma, a terapêutica anti-amiloide é baseada na proposição de que a DA é iniciada com a deposição de β -amiloide, sendo que os inibidores da fibrilogênese, inibidores da formação e promotores da depuração, ainda em experimentação, possuem propriedades anti-amiloides relevantes para estudos sobre novas estratégias terapêuticas. Outra possibilidade é a Imunoterapia para a DA, baseada no reconhecimento de um autoantígeno e resposta imunitária sem causar reações autoimunes adversas. De forma complementar, investigadores sugerem que o método terapêutico mais efetivo seria aquele baseado em desenvolvimento passivo e ativo de imunidade sobre os peptídeos A β 42 e a proteína tau, simultaneamente (SANT'ANA, 2018).

Experiências clínicas mostraram que todos os fármacos utilizados atualmente como o donepezil, a rivastigmina e a galantamina, representam formas de terapia sintomática, porém, existe uma razão para suspeitar de seu envolvimento em certos efeitos modificadores da doença incluindo a formação do peptídeo β -amiloide e a neuroproteção. Os inibidores de AChE podem interagir no sítio ativo catalítico da enzima bem como em seu sítio de ligação aniônico periférico (chamado em inglês de Peripheral Anionic Site e reduzido para a sigla PAS que será utilizada neste trabalho ao citar esse sítio), no qual supõem-se possuir a habilidade de se ligar peptídeos A β ,

assim, promovendo a fibrilogênese. Os inibidores que atuam inibindo o sítio duplo da AChE influenciam na hidrólise da acetilcolina e influenciam a agregação da β -amiloide que é dependente do PAS. Portanto compostos com estas propriedades podem ser definidas como ligantes multi-alvos.

Nos últimos anos muitos inibidores do sítio de ligação duplo da AChE com propriedades anti-agregação de β -amiloide foram descritos e coletados em artigos de revisão (IGNASIK, M. et al., 2012).

Grandes esforços têm sido realizados para a compreensão e tratamento da DA entretanto, a terapia atual está longe de ser satisfatória. De fato, embora o tratamento realizado através da administração de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) tenha consistentemente demonstrado eficácia sintomática e redução na progressão da patologia, esses medicamentos produziram algum tipo de melhora em aproximadamente 30-40% dos pacientes portadores da doença de Alzheimer leve a moderada (KIHARA T. et al., 2004).

Esses inibidores alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a acetilcolina (enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais. Desde a introdução desses medicamentos na prática clínica, os inibidores da AChE constituem o tratamento sintomático de escolha para a DA (GROSSBERG G.T., 2003).

A rivastigmina (Exelon®), atualmente um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da doença de Alzheimer, é capaz de inibir tanto a enzima acetilcolinesterase quanto a butirilcolinesterase, apresentando, assim, maior eficácia quanto ao aumento dos níveis cerebrais de acetilcolina⁶⁰. Entretanto, esse medicamento pode causar vários efeitos colinérgicos adversos quando a dose é elevada abruptamente (GROSSBERG G.T., 2003).

Esses medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico apresentam diversos efeitos adversos como alterações colinérgicos, hepatotoxicidade e distúrbios gastrointestinais adversos. Portanto, a necessidade de novos estudos clínicos e a utilização de outros alvos terapêuticos devem ser trabalhadas (SERENIKI et al., 2008).

Os fármacos mencionados anteriormente, juntamente com a memantina que é um antagonista não-competitivo de N-metil-D-aspartato (NMDA) que atua na melhora moderada na memória e funções cognitivas, (ROY, K. K. et al., 2008 & MEHTA, M. et al., 2012), constituem o arsenal terapêutico aprovado, atualmente,

para o tratamento da DA na maioria dos países. As dosagens usuais são descritas na tabela abaixo:

Tabela 1: Dosagens usuais.

Nome do fármaco	Dose inicial	Dose máxima	comentários
Donepezila	5 mg por via oral uma vez ao dia	23 mg uma vez ao dia (para DA moderada a grave)	Geralmente bem tolerada, mas pode causar náuseas ou diarreia
Galantamina	4 mg por via oral duas vezes ao dia Liberação prolongada: 8 mg uma vez ao dia	12 mg duas vezes ao dia Liberação prolongada: 24 mg uma vez ao dia	Possivelmente mais benéfico para sintomas comportamentais que outros fármacos Modula os receptores nicotínicos e parece estimular a liberação de acetilcolina e aumentar o seu defeito
Memantina	5 mg por via oral duas vezes ao dia	10 mg duas vezes por dia	Usada em pacientes com DA moderada e grave
Rivastigmina	Líquido ou cápsula: 1,5 mg duas vezes ao dia Adesivo: 4,6 mg/24h	Líquido ou cápsula: 6 mg duas vezes ao dia Adesivo: 13,3 mg/24h	Disponível em solução líquida e como adesivo.

Fonte: Manuais MSD edição para profissionais, 2023.

Perante a eficácia limitada dos atuais inibidores da AChE, os eventuais problemas de hepatotoxicidade e outros efeitos secundários e também interações medicamentosas, e visto proporcionarem unicamente um tratamento sintomático, continua a existir uma procura contínua por moléculas com maior eficácia, seletividade, menor toxicidade e que proporcionem uma terapêutica eficaz nas fases avançadas da doença. Entre os grupos de moléculas alvos de estudo encontram-se as pirazolininas, as quais serão relatadas posteriormente.

Além dos fármacos já aprovados pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para tratar a DA, um sexto fármaco está em análise para aprovação, a aducanumab. Apesar disso, os métodos farmacológicos são ainda insatisfatórios para o tratamento cognitivo-comportamental (ALZHEIMER'S DEMENT, 2021).

2.5 O PAPEL DA QUÍMICA MEDICINAL NA DESCOBERTA E NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

A descoberta de produtos naturais para utilização como fármacos tem sofrido uma grande evolução desde a década de 40 do século XX. Durante os primeiros 30 anos, as estratégias eram relativamente simples, melhoradas, em termos de produtividade, pelos avanços ocorridos na tecnologia nas duas décadas seguintes (KATZ; BALTZ, 2016).

Muitas moléculas com propriedades biológicas são ou foram planejadas a partir de produtos naturais. Os produtos naturais são utilizados há anos pela população para o alívio ou cura de algumas doenças. Com o avanço da ciência, inúmeros pesquisadores estudaram formas de melhorar o rendimento e os efeitos terapêuticos de muitos produtos naturais. O século XIX também foi caracterizado pelo desenvolvimento de métodos de extração e purificação de materiais de origem natural que permitiram as primeiras descobertas dos compostos ativos em plantas (ex. morfina – isolada da cápsula de papoula em 1804; quinina – isolada da casca da chinchona em 1820; cocaína – isolada das folhas de coca em 1855) bem como o estabelecimento da química orgânica sintética que desenvolveu rotas para processos industriais que seriam aplicados na fabricação em larga escala dos primeiros medicamentos (ex. síntese do ácido acetilsalicílico, puro e estável, pelo químico Felix Hoffmann em 1897 e síntese em larga escala e comercialização da heroína pelo Laboratório Bayer em 1898) (WERMUTH, C.G; 2008; FOYE, W. O et. al., 2008).

Sendo uma ciência interdisciplinar, a química medicinal pode se situar na interface entre a química orgânica e as ciências da vida, tais como bioquímica, farmacologia, biologia molecular e toxicologia, além de também permear áreas relacionadas à química, tais como físico química, cristalografia, espectroscopia e técnicas de simulações computacionais (AMARAL, A. T; 2017).

De acordo com o Subcommittee on Medicinal Chemistry and Drug Development da Chemistry and Human Health Division (VII) da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), a Química Medicinal é uma área que estuda os aspectos relacionados à descoberta, invenção e preparação de substâncias bioativas de interesse terapêutico, e os fatores moleculares do modo de ação dos fármacos, incluindo a compreensão da relação entre estrutura química e atividade (SAR do

inglês, Structure-Activity Relationships), além de aspectos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (WERMUTH, C.G; 2008).

A busca por novos agentes naturais para o tratamento da DA vai além dos inibidores da acetilcolinesterase, os quais têm como objetivo estabilizar os níveis de acetilcolina nas fendas sinápticas para manter a neurotransmissão. Torna-se um desafio a busca por diferentes abordagens terapêuticas com resultados mais eficazes. Neste contexto podem ser consideradas as pirazolininas, grupo com grande importância na química moderna, as quais serão exploradas na seção a seguir.

Um fármaco pode ser definido como uma substância que produz um determinado efeito terapêutico em um dado organismo. As estratégias de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos têm avançado consideravelmente nas últimas décadas, se beneficiando de avanços científicos e tecnológicos nas diversas áreas de interface entre a Química e a Biologia (STUMPFE; BAJORATH, 2012).

O processo do desenvolvimento é bastante complexo e demorado, envolvendo múltiplas etapas (figura 8), dentre elas, a identificação e o desenvolvimento de compostos com atividade biológica, bem como a determinação do mecanismo de ação, até a descoberta de novas entidades químicas (NCEs, na sigla em inglês para New Chemical Entities) (LEESON, 2012; LOMBARDINO & LOWE; 2004), estas que podem vir a ser de fato um novo fármaco.

Estima-se que são necessários de 10 a 15 anos até uma molécula ser aprovada como um fármaco (FAPESP, 2023). A primeira etapa de desenvolvimento é a pesquisa de compostos candidatos a fármacos, neste período investiga-se um grande número de moléculas (de 5000 a 10000). Na segunda etapa, o número de compostos é mais restrito e são realizados os ensaios pré-clínicos. A terceira etapa é composta pelos ensaios clínicos, que são divididos em três fases (Fase 1, Fase 2 e Fase 3). A quarta etapa consiste na submissão do pedido a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e na quinta etapa apenas uma molécula é aprovada pelo órgão responsável e comercializada. Após a comercialização ainda são realizados estudos por um período indefinido (Figura 7) (LYNCH, S.S. 2022).

Figura 7: Etapas envolvidas no desenvolvimento de um fármaco.



Fonte: Interfarma, 2022.

Em geral, para que um novo fármaco seja lançado no mercado, são necessários alguns longos anos de desenvolvimento, com um gasto estimado entre 800 milhões a 1,4 bilhões de dólares (GELDENHUYS et al., 2006). Dessa forma, é necessária a utilização de técnicas que otimizem o planejamento de novas entidades químicas que possam atuar como fármacos, com o intuito de minimizar custo e tempo (MEEK et al., 2006).

A maior parte das tecnologias fornece à comunidade científica grande diversidade de dados e informações que podem ser traduzidas em conhecimento químico e biológico. Com esse propósito, as técnicas computacionais aplicadas ao estudo de sistemas biológicos mostram-se eficazes no manejo de dados e mapeamento da estrutura 3D de alvos moleculares e ligantes, guiando a identificação e otimização de novos candidatos a fármacos (HANN, M.M.; LEACH, A. R.; GREEN, D.V.; 2005 & KLEBE, G. 2004).

Desde a concepção do alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco, o que pode levar uma década ou mais, inúmeras abordagens computacionais de bioinformática e quimio informática podem ser aplicadas nos diferentes estágios do processo de desenvolvimento. Nos estágios iniciais, o foco principal concentra-se em identificar possíveis ligantes para um alvo biológico, enquanto que nos estágios finais

a ideia é trabalhar apenas com ligantes que tenham propriedades físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas ideais para se tornarem fármacos e adentrar o mercado farmacêutico (ALONSO, H.; BLIZNYUK, A, A.; GREARY, J. E; 2006 ; TALEVI, A.; BRUNO-BLANCH, L. E.; 2009).

Uma das principais técnicas utilizadas na busca e descoberta de compostos de partida é a triagem virtual (KLEBE, G. 2004 & KROEMER, R.T. 2007, & VYAS, V.; et al.; 2008). As técnicas de triagem virtual, através da utilização de métodos computacionais, também conhecidos pelo termo “in silico”, auxiliam na seleção de compostos orgânicos promissores como ligantes de alvos terapêuticos de interesse, sejam eles agonistas ou antagonistas de receptores, ou ainda inibidores enzimáticos (IRWIN, J. J.; SCHOICHET, B. K, 2005).

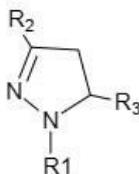
Normalmente, a estrutura química de possíveis ligantes advém de bases de dados que contém milhares de compostos com propriedades físico-químicas semelhantes às exibidas por fármacos reconhecidos na prática clínica, além de grande diversidade química e, portanto, preenchendo os requisitos básicos para garantir ampla gama de possíveis interações intermoleculares com os mais diversos alvos moleculares (IRWIN, J. J.; SCHOICHET, B. K, 2005).

2.5.1 PIRAZOLINAS

Compostos heterocíclicos sintéticos são de grande importância para a química moderna devido à sua ampla aplicabilidade em diversos campos, incluindo a química medicinal. De fato, cerca de 85 % dos fármacos disponíveis hoje são de origem sintética. Desses, 62 % são compostos com estruturas heterocíclicas e, além disso, 91 % dos fármacos heterocíclicos disponíveis na atualidade contêm nitrogênio no seu núcleo base (BARREIRO; FRAGA, 2015).

As pirazolinas são exemplos importantes de compostos sintéticos heterocíclicos que contêm um anel de cinco membros extremamente estável, composto por um átomo de nitrogênio na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 2 e uma ligação dupla entre o nitrogênio 2 e o carbono 3 (Figura 7).

Figura 8. Estrutura geral das pirazolininas.



Fonte: Elaborado pela autora.

A síntese desses compostos ocorre a partir da ciclização de chalconas (cetonas aromáticas α,β -insaturadas) por diferentes métodos, dentre eles, a reação de chalconas com hidrazinas em refluxo com ácido acético (KUMAR et al., 2011). Os derivados pirazolínicos resultantes dessa rota de síntese tem sido extensivamente explorado na área da química medicinal como moléculas candidatas a estudos de relação estrutura-atividade com potencial utilidade terapêutica (TÓTH et al., 1989; SZÖLLÖSY et al. 1991; LÉVAI 1998; LÉVAI et al. 2002; LÉVAI et al., 2004; LÉVAI, 2005; LÉVAI; JEKO, 2005).

Frequentemente as pirazolininas são obtidas por meio de chalconas em refluxo de ácido acético, o que leva a acetilação da pirazolina em tempos reacionais consideravelmente elevados (SWARNKAR, D. E. A.; 2014). Também é reportado na literatura a síntese de pirazolininas sob irradiação de micro-ondas, levando a diminuição do tempo de reação, porém, acetilando o produto final (SWARNKAR, D. E, 2014).

Derivados de pirazolininas vêm atraindo atenção na química medicinal pois estão associadas a diversas atividades biológicas, dentre estas atividades podemos citar a antimicrobiana (KARTHIKEYAN, M. S.; HOLLA, B.S.; KUMARI, N.S.; 2007, & OZDEMIR, A.E.A.; 2007) anti-inflamatória (CHANDRA, T.E.A.; 2010). A classe química das pirazolininas representa uma alternativa terapêutica frente a DA e estudos que investiguem sua ação são necessários (KARTHIKEYAN, M. S.; HOLLA, B.S.; KUMARI, N.S.; 2007 & NEUENFELDT, P.D.; 2015).

2.6 QUIMIO INFORMÁTICA E ABORDAGEM RACIONAL

Vários programas de “docagem” que usam diferentes filosofias metodológicas estão disponíveis. Um dos programas mais utilizados na atualidade incluem como exemplos o GOLD (VERDONK, M.L., et. al.; 2003), GLIDE (FRIESNER, R.A.; et.al.;

2004; & HALGREN, T.A.; et.al.; 2004) e AutoDock (RODRIGUES, R.P.; et.al.; 2012), estes têm a vantagem adicional de serem gratuitos para instituições acadêmicas.

A técnica de docagem molecular é popular justamente pelo seu potencial de identificação de compostos com características químicas e estruturais distintas de ligantes usuais e conhecidos para um alvo molecular específico (WASZKOWYCZ, B. 2008), principalmente quando a base de dados utilizada garante elevado grau de diversidade e representatividade molecular, permitindo, assim, explorar ao máximo o grau de variabilidade química requerido para interação de possíveis ligantes em um alvo molecular através da complementaridade com o sítio receptor. Os protocolos de docagem são formados, de maneira geral, por dois componentes: o algoritmo de busca e a função de escore. O algoritmo é utilizado na busca sistemática de orientações e conformações do ligante no sítio receptor e a função de escore é aplicada aos possíveis modos de ligação propostos pelo algoritmo, com o propósito de classificá-los por afinidade de acordo com suas interações com os resíduos de aminoácidos do sítio receptor (DIAS, R.; AZEVEDO, W.F; 2008).

O planejamento de novos fármacos auxiliado por computador (Computer-Aided Drug Design, CADD) pode ser empregado para melhorar a eficiência do processo de descoberta, podendo reduzir em até 50% o custo da pesquisa por um novo agente terapêutico (GELDENHUYS et al., 2006).

2.6.1 ESTRATÉGIAS COMUMENTE UTILIZADAS EM QUIMIOINFORMÁTICA (SBDD E LBDD)

Estas estratégias computacionais podem ser aplicadas de forma "indireta" e "direta". O primeiro não depende da estrutura 3D do receptor e é denominado, também, como "planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante" (LBDD, do inglês "Ligand-Based Drug Design") (SODERO, 2011). O segundo depende da estrutura 3D do complexo ligante-receptor é conhecido, também, como "planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor" (SBDD, do inglês "Structure-Based Drug Design") (KONTOYIANNI, MCCLELLAN & SOKOL, 2004). A escolha da melhor estratégia depende das informações disponíveis relacionadas ao conhecimento das estruturas dos ligantes e do alvo (OMS, 2000).

Os métodos de SBDD baseando-se no conhecimento do arranjo topológico de alvos biológicos, logo, utilizam como pré-requisito dados 3D detalhados da macromolécula em estudo. Essa informação pode ser obtida mediante a análise de

28 estruturas cristalográficas, de RMN ou de modelagem por homologia (ANDRICOPULO et. al., 2009). A docagem molecular é uma das principais estratégias de SBDD, que consiste na predição da conformação bioativa de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula (proteína-alvo), seguido da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (ANDRICOPULO et. al., 2009).

O reconhecimento molecular de um ligante no sítio receptor de um alvo ocorre por complementaridade química entre as estruturas em estudo. Este é um processo que envolve fatores entálpicos e entrópicos considerando a flexibilidade do ligante e da proteína, o efeito do ambiente protéico na distribuição de cargas do ligante, e possíveis interações com moléculas de água presentes no meio (ALONSO, BLIZNYUK & GREARY, 2006).

Os programas de docagem molecular geralmente são formados por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca (orientação e conformação) e uma função de pontuação (VERDONK et al., 2003). O algoritmo de busca é empregado na pesquisa de possíveis modos de ligação entre o ligante e a proteína, a fim de se alcançar uma complementaridade estérica e eletrostática. O algoritmo de busca deve pesquisar detalhadamente a energia potencial para que se obtenha o mínimo global. A função de pontuação é aplicada para eleger os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, dentre os modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca, classificando-os de acordo com as energias de interação (VERDONK et al., 2003). Neste trabalho foi empregado o programa de docagem molecular GOLD.

Os custos sempre crescentes da descoberta de fármacos resultaram no desenvolvimento de muitas técnicas para screening virtual. Uma das técnicas mais simples e mais amplamente utilizada é as buscas por similaridade em que uma conhecida estrutura bioativa de referência é procurada em uma base de dados para identificar as moléculas mais similares, uma vez que essas são as mais prováveis de exibir bioatividade de interesse (HOLLIDAY, J. D. et al., 2011).

O avanço da química combinatória e o aumento de informações estruturais e genômicas de potenciais alvos biológicos para ação farmacológica permitiu o

surgimento de uma abordagem menos dependente do acaso no desenvolvimento de novos fármacos. Em especial, avanços na biologia molecular e estrutural, bem como nas ciências da computação, permitiram um grande aumento na determinação de estruturas tridimensionais de vários alvos moleculares com alta resolução. De uma maneira simples, os cientistas usam a química combinatória para criar enormes populações (coleções) de moléculas - ou bibliotecas, que podem ser ensaiadas eficientemente em massa. Pela produção de compostos diversos em bibliotecas, há um aumento da probabilidade de encontrar novos compostos de valor terapêutico e comercial. Este campo representa a convergência da química e biologia (LEITAO, A.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; 2000).

Uma das principais técnicas utilizadas atualmente na busca e descoberta de compostos de partida é a triagem virtual (KLEBE, G. 2004 & KROEMER, R. T, 2007 & VYAS, V.; 2008 et al.; 2008).

As estratégias de triagem virtual compreendem, basicamente, duas abordagens principais: a triagem baseada na estrutura do alvo molecular e a triagem baseada em ligantes. As técnicas baseadas na estrutura do alvo molecular consideram a estrutura tridimensional (3D) do alvo terapêutico, utilizando como estratégia principal os cálculos de docagem para seleção de ligantes potenciais, com características químicas, eletrônicas e estruturais que favorecem interações com o sítio ligante do alvo molecular. O planejamento de substâncias bioativas com base na estrutura do alvo molecular é uma das estratégias mais robustas de identificação de novos ligantes, capaz de contribuir em todo o processo, desde a análise da estrutura 3D do alvo terapêutico até a otimização das interações moleculares e propriedades farmacocinéticas de compostos candidatos a ensaios clínicos (ANDERSON, A.C, 2003 & TAFT, C. A.A; DA SILVA, C.H.T.P.; 2008).

O programa GOLD, por exemplo, utiliza uma variação desse algoritmo, com modificações de diedros dos ligantes, geometria de anéis e modificações na posição do ligante no sítio ativo do alvo molecular (RICARDO P. R et al.; 2012).

Nos últimos anos, grande ênfase tem sido direcionada à caracterização de propriedades “drug like”, incluindo a regra dos Cinco, de Lipinski (LIPINSKI, C.A. et al.; 2001), com o intuito de minimizar o risco de seleção de moléculas com a atividade biológica desejada, mas que são inadequadas do ponto de vista de propriedades muito importantes em farmacoterapia, tais como: biodisponibilidade, permeabilidade, absorção, metabolismo, excreção e toxicidade. A escolha de uma biblioteca virtual de

compostos com propriedades consistentes com o conceito “drug like” pode reduzir o tempo do ciclo de desenvolvimento e minimizar a inviabilidade de aplicação terapêutica de moléculas bioativas por inadequação de propriedades farmacocinéticas e/ou toxicidade acentuada (LUMLEY, J.A, 2005 & BRENK, R.; et al.; 2008), propriedades estas que representam o principal gargalo no insucesso de candidatos a fármacos (EDDERSHAW, P. J.; BERESFORD, A. P.; BAYLISS, M.K.; 2000 & SHEPPARD, G.S.; BOUSKA, J.J. 2005).

No desenvolvimento de novos compostos, o desenvolvimento baseado na estrutura, como a docagem molecular, pode ser aplicado baseado na estrutura cristalográfica disponível da AChE em complexo com inibidores. Simulações de docagem molecular têm sido utilizadas com sucesso em muitos projetos de química medicinal fazendo delas ferramentas valiosas na descoberta de potenciais fármacos (BERG, L. et al., 2011).

2.6.2 QUÍMICA QUÂNTICA

Devido aos recentes progressos na área computacional e no desenvolvimento de eficientes algoritmos de cálculos, um grande avanço também foi verificado no desenvolvimento dos cálculos químico-quânticos. Métodos ab initio e semiempíricos fornecem parâmetros químico-quânticos moleculares realísticos em um curto período de tempo. Cálculos químico-quânticos são, então, uma grande fonte de descritores moleculares que podem, em princípio, expressar muitas propriedades geométricas e eletrônicas das moléculas e suas interações. De fato, vários estudos recentes sobre QSAR/QSPR empregam descritores químico-quânticos isoladamente ou combinados com descritores convencionais (WEBER, K. C.; et al., 2006 & FERNADEZ, M. CABALLERO, J. J.; 2007). A Química Quântica fornece uma descrição mais acurada e detalhada dos efeitos eletrônicos quando comparada aos métodos empíricos.

Métodos de Química Quântica e técnicas de modelagem molecular permitem a definição de um grande número de propriedades atômicas e moleculares caracterizando propriedades relacionadas à reatividade, forma e modo de ligação de fragmentos e substituintes moleculares. Devido ao grande conteúdo de informações contidas em muitos descritores moleculares, a utilização dos descritores químicos-quânticos em estudos de QSAR apresenta duas vantagens principais: os compostos e seus vários fragmentos e substituintes podem ser diretamente caracterizados com

base somente em suas estruturas moleculares; o mecanismo de ação proposto pode ser diretamente justificado em termos da reatividade química dos compostos em estudo. Conseqüentemente, os modelos de QSAR obtidos incluirão informações sobre a natureza das forças intermoleculares envolvidas na determinação da atividade biológica dos compostos em estudo. Descritores químico-quânticos são fundamentalmente diferentes das medidas obtidas experimentalmente, embora exista alguma sobreposição natural (ARROIO, A.; HONORIO, K.M.; SILVA, A. B. F, 2010).

Uma outra categoria de descritores químico-quânticos muito utilizados em estudos SAR/QSAR está relacionada à energia dos orbitais de fronteira. Em geral, são utilizadas as energias do orbital molecular mais alto ocupado (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) e do orbital molecular mais baixo desocupado (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO). A razão para isto está relacionada ao fato destas propriedades fornecerem informações sobre o caráter elétron-doador e/ou elétron-aceitador de um composto e, conseqüentemente, a formação de um complexo de transferência de carga (CTC) (HONORIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F.; 2003).

A energia do HOMO mede o caráter elétron-doador de um composto e a energia do LUMO mede o caráter elétron-aceitador. Destas definições, duas características importantes podem ser observadas: quanto maior a energia do HOMO, maior a capacidade elétron-doadora e, quanto menor a energia do LUMO menor será a resistência para aceitar elétrons. As energias do HOMO e do LUMO têm sido usadas há algumas décadas como índices de reatividade química e são comumente correlacionadas com outros índices, tais como afinidade eletrônica e potencial de ionização (CONTRETAS, R, et al.; 1999 & HEATON, C.A.; MILLER, A. K.; POWELL, R.L.; 2001).

2.6.3 TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE– DFT

Em muitos campos da ciência a chave para o progresso científico e tecnológico é o entendimento e o controle das propriedades da matéria em nível atômico e pequenas moléculas. A teoria do funcional da densidade é uma abordagem bem sucedida para encontrar soluções para a equação fundamental que descreve o comportamento quântico de átomos e moléculas, a equação de Schrödinger.

Essa abordagem se transformou rapidamente de uma arte especializada, praticada por um pequeno número de físicos e químicos na vanguarda da teoria da

mecânica quântica, para uma ferramenta que é usada regularmente por um grande número de pesquisadores em química, física, ciência dos materiais, engenharia química, geologia e outras disciplinas (SHOLL; STECKEL, 2009a).

A teoria do funcional da densidade (DFT - Density Functional Theory) usa a densidade eletrônica como variável fundamental, no lugar da função de onda. A DFT é a base de uma nova classe de métodos de cálculo de estrutura eletrônica em expansão e com grande potencial. Esse método surgiu como uma alternativa aos tradicionais métodos semi-empíricos e *ab initio*, no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares. Além disso, tem apresentado boa concordância com os dados experimentais disponíveis (SHOLL; STECKEL, 2009).

O método DFT inclui de forma implícita a correlação eletrônica nos cálculos, muito explorado, pois permite o estudo de sistemas com grande número de átomos e apresenta um custo computacional menor em relação aos métodos *ab initio*. Devido ao fato de que, ao usar a densidade eletrônica, a integral para repulsão de Coulomb necessita ser feita somente sobre a densidade eletrônica, que é uma função tridimensional, como N^3 , em que N é o número de funções de bases, enquanto os métodos *ab initio* escalam acima de N^4 (KOCH; HOLTHAUSEN, 2001).

Os cálculos realizados pelo método DFT são todos baseados em função da densidade eletrônica ou na densidade de probabilidade eletrônica do sistema em questão, essa função é habitualmente chamada de densidade eletrônica ou densidade de carga, é representada por $\rho(x, y, z)$. Assim, para se obter a energia para a densidade eletrônica é utilizado um funcional de densidade, e a minimização desse funcional é obtido a energia do estado fundamental do sistema.

Deve-se lembrar também que, um funcional é uma função de uma função, neste caso, essa função é a densidade eletrônica. Não é possível se obter resultados exatos para um funcional de densidade. Podem ser encontrados diversos funcionais que apresentam vantagens e desvantagens para descrever um sistema multi eletrônico (ROCHA, 2013).

2.7 METABOLISMO DOS FÁRMACOS

A absorção do fármaco no trato gastrointestinal (TGI), é complexa e pode ser influenciada por vários fatores, os quais têm impacto sobre a dissolução/solubilidade

e permeabilidade do fármaco. Estes podem ser resumidos em fatores fisiológicos, físico-químicos e farmacêuticos (SHARGEL et al., 2005). Fatores fisiológicos estão relacionados às características anatômicas e fisiológicas do local de administração como, por exemplo, tempo de esvaziamento gástrico, motilidade intestinal, pH intestinal, mecanismos envolvidos no transporte de fármacos através das membranas dos enterócitos, metabolismo pré-sistêmico, fluxo de sangue no intestino, conteúdo luminal, composição dos fluidos intestinais e estados patológicos do paciente (YU et al., 1996; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

A absorção de fármacos tem um papel essencial na determinação da sua biodisponibilidade (F), uma vez que contribui ativamente com o tempo e extensão em que um fármaco é exposto ao seu sítio de ação farmacológico *in vivo* (SUN et al., 2004).

A dissolução do fármaco nos líquidos do TGI e a sua permeabilidade através da membrana plasmática são os requisitos para que este atinja a circulação sistêmica e esteja biodisponível. As propriedades moleculares do fármaco são determinantes tanto para a solubilidade aquosa do mesmo, quanto para a permeabilidade através da bicamada fosfolipídica da membrana biológica (SHARGEL et al., 2005).

Assim, um fármaco deverá apresentar características hidrofílicas suficientes que permitam sua dissolução nos líquidos corporais, já que estes têm a água como principal componente. Por outro lado, as moléculas devem ter características hidrofóbicas que as possibilite atravessar a bicamada fosfolipídica da membrana da célula. É importante ressaltar que a maioria dessas propriedades são dependentes umas das outras (AVDEEF, 2012).

Há fatores importantes que devem ser avaliados no estudo de permeabilidade de fármacos, como a lipofilicidade ($\log P$). O $\log P$ é calculado pela razão entre a solubilidade do fármaco em um solvente apolar (por exemplo, octanol) e sua solubilidade em um solvente polar, a água. Quanto maior o valor de $\log P$, maior a afinidade pela estrutura lipídica da membrana plasmática e conseqüentemente maior taxa de partição e absorção. Entretanto, vários estudos têm indicado que fármacos muito hidrofílicos ($\log P < -3$) e muito hidrofóbicos ($\log P > 6$) estão sempre associados a uma absorção *in vivo* incompleta (UNGELL; ABRAHAMSSON, 2009).

Numa correlação entre a permeabilidade e o $\log P$ geralmente uma relação sigmoide é obtida. À medida que o $\log P$ de uma molécula aumenta, também o faz a sua capacidade de penetrar na membrana celular, resultando no aumento da

permeabilidade até que um platô, referente à limitação gerada pela CAE adjacente à membrana, seja atingido (AMIDON; LEE; TOPP, 2000).

Outro fator é a constante de dissociação (pKa), inter-relaciona o pH do meio e o estado de carga. Conceitualmente, o valor de pKa é aquele onde uma molécula está 50% ionizada e 50% na forma não-ionizada. Conforme a teoria da partição em pH, os fármacos são transportados através de barreiras biológicas primariamente quando estão na forma não-ionizada, sendo que seu pKa é responsável por direcionar seu local de absorção no trato gastrointestinal (HOGBEN et al., 1959; REIS, 2013). Por esta razão, esta teoria prevê que condições de pH que favoreçam a forma não-ionizada de um fármaco possibilitem maiores valores de permeabilidade.

O peso molecular que pode atuar como uma limitação física ao transporte de alguns fármacos, principalmente quando a via passiva celular é considerada. Atribui-se o valor de 200 Da para o peso molecular de um fármaco, para que este possa atravessar as junções coesas presentes entre as células endoteliais, assim, permear pela via passiva (FUGIKAWA et al., 2005). A partir de uma projeção gráfica entre PM e logP, Ritchie e colaboradores (2011) demonstraram que, numa seleção de 178 fármacos, o máximo valor de permeabilidade é apresentado por fármacos com PM entre 150-350 Da e logP entre 0 e 3,5 (RITCHIE; ERTL; LEWIS, 2011).

Outro fator é a área de superfície polar, ou “Polar Surface Area” (PSA) é definida como a soma da área de superfície de todos os átomos polares de uma molécula, usualmente oxigênio, nitrogênio e hidrogênio (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000). De maneira geral, os parâmetros de PSA são calculados de forma mais fidedigna quando o número de ligações de hidrogênio é avaliado a partir da estrutura 3D da molécula (BOHETS et al., 2001).

Conforme descrito na literatura, valores de PSA abaixo de 120 \AA^2 são indicados para garantir boa absorção de fármacos administrados por via oral e transportados passivamente (FLATEN et al., 2006; BOHETS et al., 2001; ZHU et al., 2002). Por outro lado, para que os fármacos atravessem a barreira hematoencefálica, o valor de PSA não deve exceder 60 \AA^2 (ERTL; Rohde; Selzer, 2000). Estudos que avaliaram a correlação entre as propriedades de PSA e o logP, demonstraram que os fármacos que apresentam valores de PSA fora da faixa de 10 a 125 \AA^2 e logP entre -1 e 6 demonstraram problemas de biodisponibilidade (RITCHIE; ERTL; LEWIS, 2011).

O número de doadores de ligação de hidrogênio também deve ser observado, pois camadas lipídicas ordenadas apresentam uma quantidade finita de grupamentos com ligação de hidrogênio. Estes grupamentos estão localizados exclusivamente nas cabeças polares dos fosfolipídios. Para que tenham afinidade às cadeias de hidrocarbonetos da camada lipídica, os fármacos devem ser suficientemente lipofílicos para superarem a perda de energia gerada na quebra das ligações de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolipídios. Este fator representa, portanto, uma barreira energética considerável para fármacos que possuam tendências a fortes ligações doadoras de hidrogênio (MALKIA et al., 2004).

A capacidade de um fármaco formar ligações de hidrogênio tem sido reportada na literatura como marcadamente interferente na sua permeabilidade (TAYAR et al., 1991; CONRADI et al., 1991; REIS, 2013).

2.8 REGRA DE LIPINSKI

A regra dos 5 introduzida por Lipinski ainda é o modelo mais usado na aplicação de propriedades físico-químicas para a predição da permeabilidade de fármacos. O modelo, baseado em um estudo de aproximadamente 2290 fármacos, prevê valores altos de absorção para fármacos que se enquadrem ao menos duas das seguintes características: grau de lipofilicidade ($\log P$) de até de 5, PM de até 500 e HBD inferior a 5 (LIPINSKI et al., 2001).

Lipinski et al., em 1997, analisaram 2.245 compostos provenientes do banco de dados do World Drugs Index e identificaram propriedades fármaco-similar (do inglês drug-like) entre os fármacos disponíveis por via oral. Esse trabalho analisou quatro propriedades físico-químicas entre medicamentos orais e candidatos a fármacos, definindo pontos de cortes comuns a 90% das substâncias analisadas. Essas informações foram traduzidas em um conjunto de regras chamado de Regra dos 5 ou RO5 (do inglês Rule of five), pois os fatores descritos envolviam números múltiplos de cinco: (PATRICK, G.L.; 2013 & WALTERS, W.P.; 2012).

- Peso molecular (PM) < 500 Da;
- Grupos doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 ;
- Grupos aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ;
- Coeficiente de lipofilicidade ($\log P$) ≤ 5.6

Considerando que a maioria dos fármacos administrados por via oral são transportados passivamente, (BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M; 2015) o aumento do PM pode impedir a difusão passiva através das cadeias laterais alifáticas compactadas na bicamada lipídica das membranas biológicas. Além disso, à medida que o PM aumenta, uma cavidade maior deve ser formada em água para solubilizar o composto, o que pode diminuir a solubilidade. O aumento do peso molecular também reduz a concentração de composto na superfície do epitélio intestinal, em consequência, a absorção também pode ser reduzida (DI, L.; KERNS, E.H.; 2015).

A lipofilicidade de um composto é avaliada pelo coeficiente de partição (LogP) que, por sua vez, é a razão entre a concentração da substância na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa em um sistema de dois compartimentos em equilíbrio. Experimentalmente, essa propriedade é determinada através do método de shake flask com o emprego de n-octanol na fase orgânica, devido à sua similaridade físico-química com a bicamada de lipídeos das membranas celulares (KUBINYI, H.; 1997).

Fármacos mais lipossolúveis são melhores absorvidos, entretanto, um incremento na lipossolubilidade pode reduzir a absorção, pois a redução da hidrossolubilidade dificulta etapas anteriores, como dissolução e solubilização do fármaco na fase aquosa (BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M; 2015; DI, L.; KERNS, E.

H.; 2015). Desse modo, o perfil de lipossolubilidade é descrito como um modelo em parábola bilinear, o qual compreende valores ótimos de LogP na faixa de 1 a 3, capazes de expressar propriedades farmacocinéticas ideais, com prejuízo se houver o aumento progressivo do LogP, uma vez que o balanço hidrofílico-lipofílico é necessário para a absorção (BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M; 2015).

2.9 MODELOS DE AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL DOS FÁRMACOS

A permeabilidade intestinal é a capacidade que o composto tem de atravessar a barreira biológica e pode variar conforme sua localização no trato gastrintestinal (GRASS, 1997 & REIS., 2013). Considera-se um fármaco altamente permeável aquele cuja extensão de absorção em seres humanos for igual ou superior a 85% ou a 90%, dependendo da agência regulatória (UNITED STATES, 2000; YU et al., 2002; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; CHEN; YU, 2009).

Considera-se um fármaco altamente permeável aquele cuja extensão de absorção em seres humanos for igual ou superior a 85% ou a 90%, dependendo da agência regulatória (UNITED STATES, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; CHEN; YU, 2009).

O conhecimento da permeabilidade de um fármaco e dos mecanismos relacionados a este processo constitui etapa crucial no desenvolvimento das moléculas candidatas a fármacos, na determinação do local de administração de um fármaco e no desenvolvimento de formulação farmacêutica. Por este motivo, há uma grande necessidade da implementação de modelos de alta capacidade, baixo custo e que tenham uma grande correlação com as características de permeabilidade e absorção *in vivo* (AVDEEF; TESTA, 2002; FUGIKAWA et al., 2005; PRAVEEN; CHONG, 2005; CAO et al., 2006; CHEN et al., 2007; DAHAN; HOFFMAN, 2007; FISCHER et al., 2007).

Com a finalidade de avaliar a permeabilidade de fármacos, diferentes métodos foram desenvolvidos. Atualmente, um dos métodos amplamente utilizados para a caracterização da permeabilidade dos fármacos são métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais compostos por lipídeos, exemplificados pelo ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA).

E métodos *in silico* que empregam programas computacionais para a previsão da permeabilidade dos fármacos. Assim, a utilização de um destes métodos e mesmo a combinação entre eles têm sido o objeto de publicações recentes na área da biofarmácia (STENBERG, 2001; SUGANO, 2003; AVDEEF, 2005; PRAVEEN; CHONG, 2005; OBATA, 2005; MASAOKA et al., 2006; SHAH, 2006; CHEN, 2007; VOLPE, 2007).

2.10 INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

Para racionalizar estudos experimentais, os compostos podem ser estudados estruturalmente através de suas propriedades físico-químicas pela plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch>), que consiste em uma ferramenta de correlação quantitativa simples. Dentre as aplicações práticas da Química Farmacêutica e Medicinal que despertam o interesse da indústria farmacêutica estão aquelas que influenciam a etapa farmacocinética. O estudo das propriedades físico-químicas durante o planejamento de fármacos é uma etapa muito relevante para a

predição da biodisponibilidade oral de moléculas promissoras (BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M; 2015).

Quando pensamos em vias de administração de medicamentos, a via oral é a via mais utilizada e a que obtém os maiores níveis de aceitação dos pacientes. Isto se dá, por conta da sua melhor prevenção de dores, por sua eficácia, redução do risco de infecção cruzada, redução de lesões por picada de agulha e também pela praticidade (CHENTHAMARA et al., 2019).

Considerando que a biodisponibilidade de fármacos administrados pela via oral depende da permeabilidade pelas membranas celulares, solubilização nos fluidos estomacais e absorção pela mucosa intestinal, é necessário compreender os descritores moleculares capazes de prever as propriedades farmacocinéticas ideais e fornecer informações relevantes para propor modificações químicas racionais (BARREIROS, E.J.; FRAGA, C.A.M; 2015; AMARAL, A.T.; MONTANARI, C.A.; 2002).

Na tentativa de facilitar o processo de tomada de decisão e aumentar a probabilidade de encontrar e desenvolver compostos viáveis farmacologicamente em seres humanos, foram desenvolvidos vários métodos multiparamétricos chamados de regras ou filtros (MIGNANI, S. et al, 2018).

As propriedades físico-químicas dos grupos funcionais são essenciais na fase farmacodinâmica da ação dos fármacos. Tais grupos influenciam diretamente o reconhecimento molecular, pois a afinidade de um fármaco, isso é, “a tendência de um fármaco se ligar ao seu receptor”, é dependente do somatório das forças de interação dos grupos farmacofóricos aos sítios complementares da macromolécula (RANG, R.; et al. 2015).

Essas propriedades também exercem influência no comportamento farmacocinético (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), especialmente, nos medicamentos administrados pela via oral, que é a via de administração mais comum. Essa via, em comparação com a parenteral (intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica), apresenta como vantagens a facilidade na administração, maior segurança e adesão do paciente, menor custo, além de ser menos invasiva (ALLEN, J. R.; et al.; 2013).

Em contrapartida, a fase farmacocinética é uma das principais causas de descontinuidade da pesquisa de candidatos a fármacos orais nos estágios iniciais dos estudos clínicos. As propriedades físico-químicas altamente variáveis repercutem diretamente na absorção (passagem do fármaco de seu local de administração para

o plasma) e na biodisponibilidade (fração de uma dose oral que chega à circulação sistêmica na forma de fármaco intacto) de fármacos na biofase (RANG, R.; et al. 2015).

A ferramenta web SwissADME (Figura 9) é gratuita e oferece acesso a uma variedade de modelos preditivos rápidos e robustos para propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, semelhança de medicamentos e radar de biodisponibilidade. Além disso, apresenta como vantagem diferentes métodos de entrada (.sdf, .mol, SMILES, por exemplo), cálculo de várias moléculas simultaneamente e possibilidade de exibir, salvar e compartilhar resultados por cada molécula ou através de gráficos que demonstram se os fármacos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, possuem boa absorção oral e se são substratos ou inibidores da glicoproteína-P (DAIANA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V.; 2017).

Figura 9: Página principal do SwissADME

Este site permite que você calcule descritores físico-químicos, bem como prever parâmetros ADME, propriedades farmacocinéticas, natureza semelhante a drogas e compatibilidade química medicinal de uma ou várias moléculas pequenas para apoiar a descoberta de medicamentos.

O artigo principal que descreve o serviço web e suas metodologias subjacentes é *SwissADME: uma ferramenta web gratuita para avaliar farmacocinética, semelhança de drogas e compatibilidade química medicinal de pequenas moléculas. Sci. Rep. (2017) 7:42717.* Para obter detalhes sobre o desenvolvimento e validação do iLOGP, consulte este artigo: *iLOGP: uma descrição simples, robusta e eficiente do coeficiente de partição n-octanol/água para o projeto de medicamentos usando a abordagem GB/SA. J. Chem. Inf. Model. (2014) 54(12):3284-3301.* Para obter detalhes sobre o desenvolvimento e validação do BOILED-Egg, consulte este artigo: *A BOILED-Egg para prever a absorção gastrointestinal e a penetração cerebral de pequenas moléculas. ChemMedChem (2016) 11(11):1117-1121.*

Desenvolvido e mantido pelo Grupo de Modelagem Molecular do SIB | Instituto Suíço de Bioinformática.

Insira uma lista de SMILES aqui:

Fonte: SwissADME, 2023.

2.11 PERMEABILIDADE EM MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA)

A técnica de PAMPA é capaz de prever não apenas a partição água/membrana de fármacos, mas também sua solubilidade e estado de carga em diferentes valores de pH. Desta forma, apresenta vantagens competitivas importantes quando em comparação à IAM (BOHETS et al., 2001; AVDEEF et. al., 2007).

No ensaio de PAMPA, um “sanduíche” é formado por duas placas de 96 poços, sendo que a placa inferior é denominada compartimento doador, onde os fármacos a serem avaliados estão diluídos em uma solução tampão. A placa superior compõe o compartimento receptor, e apresenta membranas sintéticas de PVDF impregnadas com solução lipídica, formando uma barreira através da qual os fármacos migram por difusão.

É importante salientar que existem diversos parâmetros que podem afetar os resultados de permeabilidade obtidos pelo ensaio com a técnica PAMPA, destacam-se: composição das membranas artificiais; pH e composição do meio dos compartimentos doador e receptor; e presença ou ausência de agitação das placas, relacionada ao efeito da camada de água estacionária (CAE).

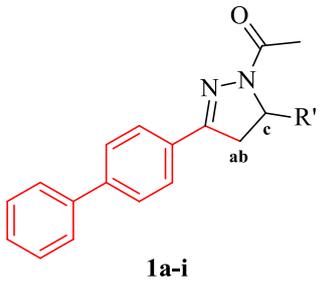
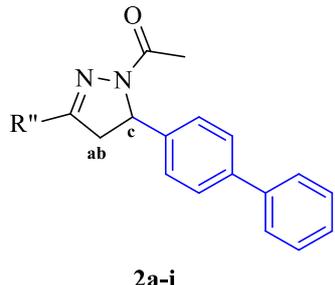
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os resultados apresentados nas seções a seguir foram previamente publicados na revista *RCS Medicinal Chemistry* (MACHADO et al.; 2022).

3.1 SÍNTESE

Como nessa dissertação o objetivo é discutir as atividades biológicas, serão suprimidos os dados relativos à síntese e caracterização das pirazolininas. A síntese das pirazolininas **1a-i** e **2a-i** (Tabela 2) foi realizada em duas etapas conforme tabela 2, e esta etapa do projeto foi desenvolvida em colaboração.

Tabela 2: Estruturas química das pirazolinas **1a-i** e **2a-i**

 1a-i		 2a-i	
Composto	R'	Compsto	R''
1a	Ph	2a	4-CH ₃ -Ph
1b	2-NO ₂ -Ph	2b	2-NO ₂ -Ph
1c	3-NO ₂ -Ph	2c	4-Br-Ph
1d	4-NO ₂ -Ph	2d	3,4,5-triOCH ₃ -Ph
1e	4-COOH-Ph	2e	2,4-diOCH ₃ -Ph
1f	2,5-diOCH ₃ -Ph	2f	2,5-diOCH ₃ -Ph
1g	3,4-diOCH ₃ -Ph	2g	3,4-OCH ₂ O-Ph
1h	3,4-OCH ₂ O-Ph	2h	1-naftil
1i	2-naftil	2i	2-naftil

As pirazolininas foram obtidas em 20-89% de rendimento e foram caracterizadas de acordo com seu ponto de fusão, ¹H e ¹³C NMR, e espectros de massas de alta resolução.

Na etapa de cálculos das propriedades físico-químicas estudadas, utilizou-se a plataforma online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) para calcular as propriedades físico-químicas dos fármacos estudados (RODRIGUES, G. et al. 2021).

3.2 EFEITO INIBIDOR DAS PIRAZOLINAS E ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

A inibição da enzima AChE foi verificada a partir da função de pontuação ChemPLP e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Todos os compostos testados mostraram efeitos inibitórios contra a AChE com valores de IC₅₀ variando entre 0,052 e 1,947 μM . Em comparação com o medicamento padrão mais ativo, a donepezila (IC₅₀ valor de 0,087 μM), dois compostos (**2b** e **2i**) da série, mostraram um efeito inibitório maior com valores de IC₅₀ de 0,052 e 0,068 μM , respectivamente. Todas as pirazolininas da série se mostraram mais potentes do que um dos medicamentos hoje disponível no mercado farmacêutico, a galantamina.

Tabela 3: Comparação entre os valores de IC₅₀ dos compostos relacionados com a inibição da AChE e as respectivas pontuações obtidas através da função de pontuação ChemPLP.

Composto	IC ₅₀ inibição do AChE ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Pontuação
1a	1,328	82.422
1b	0,640	87.822
1c	1,028	84.851
1d	1,556	79.831
1e	1,541	80.692
1f	1,421	81.686
1g	1,426	81.599
1h	0,988	85.133
1i	0,799	86.394
2^a	0,845	86.924
2b	0,052	92.519
2c	0,903	85.943
2d	1,947	77.492
2e	1,128	84.523
2f	1,705	79.426
2g	0,913	85.720
2h	1,015	84.949
2i	0,068	91.242

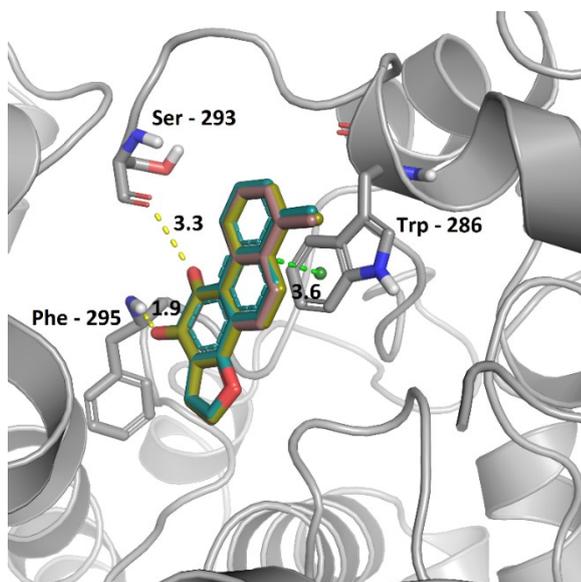
Donepezila	0,087	90.608
Galantamina	17,250	60.244
Fisiostigmina	0,190	63.616
Tacrina	0,178	62.143

Fonte: Elaborado pela autora.

IC₅₀: concentração dos compostos testados que inibiram a hidrólise do substrato em 50%; AChE: acetilcolinesterase.

Estudos de docagem molecular foram realizados para compreender melhor os resultados do IC₅₀ e para conduzir adequadamente as discussões sobre a relação estrutura-atividade. Quatro diferentes funções de pontuação do programa GOLD (JONES, G. et al. 1997) foram utilizados: GoldScore, ChemScore, ChemPLP e ASP. Através da análise dos resultados do cálculo da interação, ficou evidente que a função ChemPLP (Tabela 3) representa melhor os resultados experimentais, e por este motivo, esta função foi selecionada para as respectivas análises. Foram considerados na escolha da função o resultado do redocking (Figura 10), e as correlações entre os resultados experimentais e computacionais ($r^2 = 0,9901$) (Figura 11).

Figura 10. Sobreposições de resultados de cálculo de acoplamento molecular para o ligante co- cristalizado (1YL604).

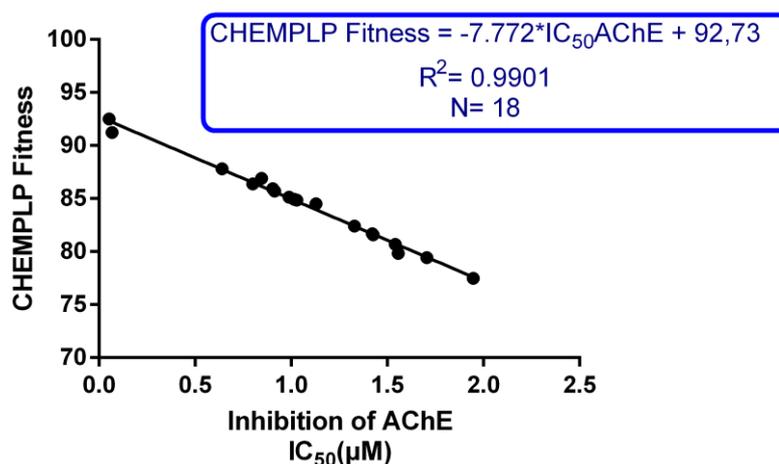


Fonte: Elaborado pela autora.

Na pose de redocking (Figura 10), três estruturas do ligante co-cristalizado (1YL604) estão presentes: em bege é o único proveniente da imagem cristalográfica, em violeta a estrutura proveniente do cálculo da série **1a-1i** em fúcsia a estrutura derivada do cálculo da série **2a-2i**. O alinhamento entre estas estruturas é evidente. A sobreposição de ambas as estruturas se apresenta praticamente igual.

Indicando e ajudando a compreender o quão bem os resultados computacionais representam os resultados experimentais.

Figura 11. Correlação entre os resultados experimentais (IC_{50}) e computacionais (Pontuação).

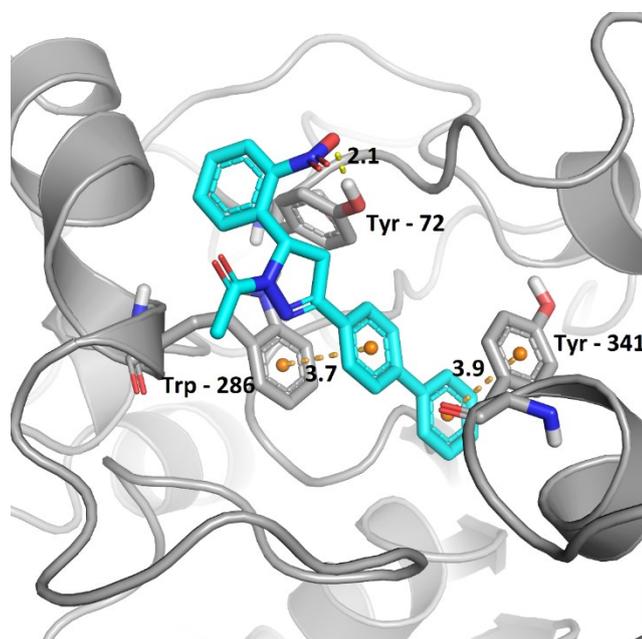


Fonte: Elaborado pela autora.

Através da análise do diagrama de interação 2D (Figura 12), é possível observar que, além das interações da ligação de hidrogênio, uma série de estruturas aromáticas e cadeias laterais hidrofóbicas estão presentes na cavidade enzimática. Sobre tudo, é importante mencionar as interações π - π que ocorrem entre a estrutura do resíduo Trp 286 e a porção aromática do ligante co-cristalizado.

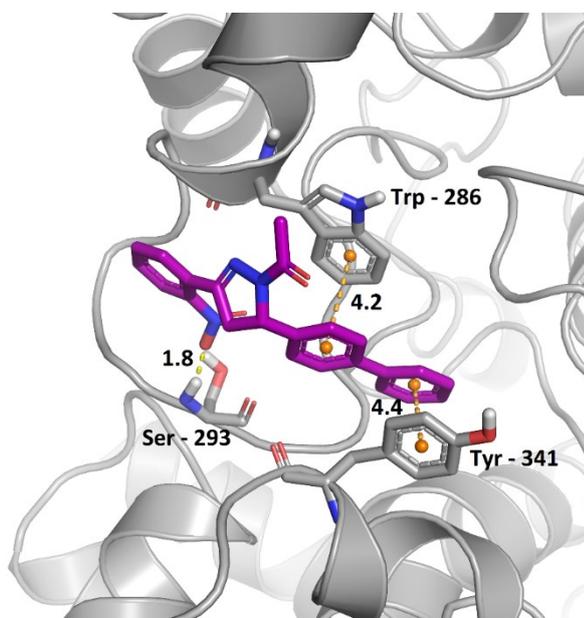
De acordo com os resultados computacionais (Tabela 3), os compostos que apresentaram as melhores pontuações, de ambas as séries, são: **1b** (Figura 13) e **2b** (Figura 14). É interessante notar a semelhança entre as interações de ambos os compostos (**1b** e **2b**) quanto às interações no sítio ativo da proteína. Para ambos, ocorrem duas interações π - π com os mesmos resíduos Trp 286 e Tyr 341.

Figura 13. Interações intermoleculares do composto **1b** na cavidade enzimática da enzima AChE.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 14. Interações intermoleculares do composto **2b** na cavidade enzimática da enzima AChE.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com base nas análises preliminares realizadas nos diagramas de interação 2D e no fato de que todos os compostos têm o mesmo esqueleto, foi evidenciado um

padrão de interação no qual pelo menos uma interação π - π é estabelecida. Esta premissa pode ser verificada observando a interação do composto menos ativo das duas séries, **2d**. Vale a pena mencionar que o padrão de interação mencionado acontece preferencialmente com a porção aromática do resíduo Trp 286.

Para racionalizar os dados obtidos experimentalmente, os compostos foram estudados estruturalmente através de suas propriedades físico-químicas pela plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch>), que consiste em uma ferramenta de correlação quantitativa e livre. As propriedades físico-químicas são fundamentais no desenvolvimento de novos fármacos, pois a partir destes dados é possível prever o comportamento e possíveis dificuldades do fármaco em ser metabolizado e se ligar a um receptor.

Os fármacos de administração oral com bom perfil farmacológico geralmente obedecem às regras de Lipinski (BARRET, R., 2018).

De acordo com Veber et al (2002), as características de um bom candidato a medicamento seriam: Número de ligações giratórias ($n_{\text{Rotb}} \leq 10$), (vi) Área de superfície polar (PSA) $< 140 \text{ \AA}^2$. Algumas dessas propriedades físico-químicas dos compostos são mostradas nas Tabelas 3 e 4. Para correlacionar as propriedades físico-químicas obtidas pela plataforma SwissADME, como peso molecular, número de átomos pesados, média do LogP, número de aromáticos pesados e fração de carbonos sp^3 , foram utilizados mapas de densidade de kernel.

Em Estatística, estimativa de densidade por Kernel (EDK) é uma forma não-paramétrica para estimar a função densidade de probabilidade (FDP) de uma variável aleatória. Estimativa EDK é um problema fundamental de suavização de dados em que inferências sobre a população são feitas com base em uma amostra de dados finita. Os mapas de densidade de Kernel são utilizados para estimar a densidade de probabilidade em um conjunto de dados de forma não parametrizada e segue a seguinte fórmula:

$$\hat{f}_h(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n K_h(x - x_i) = \frac{1}{nh} \sum_{i=1}^n K\left(\frac{x - x_i}{h}\right), \quad (1)$$

Em que K é um kernel qualquer, como por exemplo a Função de Gauss, e $h > 0$ é um parâmetro de distância chamado de largura de banda, que controla a influência dos vizinhos em um kernel. Um kernel com índice h é um kernel que já foi

escalonado pela largura de banda, e definido como $Kh(x) = 1/h K(x/h)$. Intuitivamente procura-se escolher o menor valor de h possível quanto a distribuição dos dados em uma amostra permite, no entanto, há sempre um compromisso entre o viés da estimativa e sua variância.

Tabela 4: Primeiro conjunto de propriedades físico-químicas das pirazolinas (**1a-1i** e **2a-2i**) e dos medicamentos anticolinesterásicos.

Composto	Peso Mol (g mol ⁻¹)	Num. Átomos Pesados	Num. átomos Aromáticos pesados	Fração Csp ³	Num. Rotativas obrigações
1^a	340.42	26	18	0.13	4
1b	385.42	29	18	0.13	5
1c	385.42	29	18	0.13	5
1d	385.42	29	18	0.13	5
1e	384.43	29	18	0.12	5
1f	400.47	30	18	0.20	6
1g	400.47	30	18	0.20	6
1h	384.43	29	18	0.17	4
1i	390.48	30	22	0.11	4
2^a	354.44	27	18	0.17	4
2b	385.42	29	18	0.13	5
2c	419.31	27	18	0.13	4
2d	430.50	32	18	0.23	7
2e	400.47	30	18	0.20	6
2f	400.47	30	18	0.20	6
2g	384.43	29	18	0.17	4
2h	390.48	30	22	0.11	4
2i	390.48	30	22	0.11	4
Donepezila	379.49	28	12	0.46	6
Galantamina	287.35	21	6	0.53	1

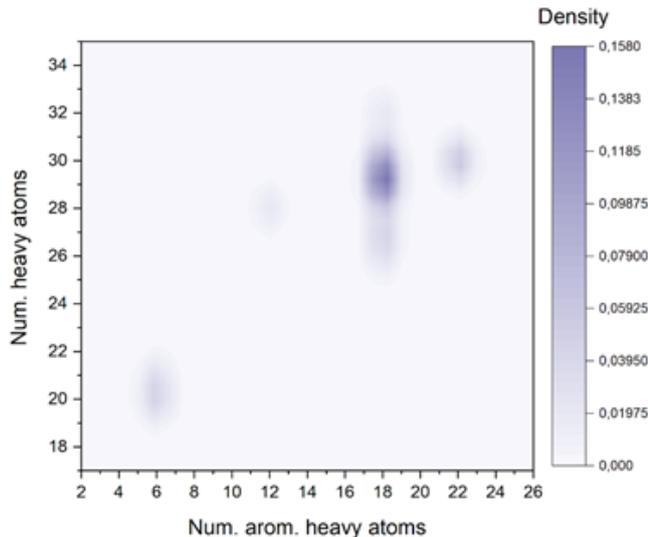
Risvastgmina	276.35	20	6	0.53	3
Tacrina	276.35	20	6	0.53	3

Fonte: Elaborado pela autora.

A abreviação (Num) na tabela acima, foi usada para substituir a palavra número.

A maioria das pequenas moléculas aprovadas como fármacos CNS tem 27 a 37 átomos pesados (WANG, Y. MICHAEL. S. HUANG, R. et al.; 2021), e entre todos os fármacos orais desenvolvidos pós-1950, 44% têm peso molecular < 400 (LEESON, P.; 2012). A grande maioria das pirazolinas investigadas neste trabalho tem peso molecular e número de átomos pesados nessa faixa. Neste sentido, ao analisar a Figura 15, é possível observar que as pirazolinas investigadas neste trabalho tem em sua maioria entre 29-30 átomos pesados e 18 átomos aromáticos pesados.

Figura 15: Densidade de Kernel de propriedades número de átomos pesados aromáticos e número de átomos pesados



Fonte: Elaborado pela autora.

Um bom candidato para a inibição da enzima acetilcolinesterase para o tratamento da DA deve incluir valores logP entre 4,8 e 4,9, área de superfície polar entre 30,0 e 60,0 Å², ser de preferência um sistema aromático e ter aceptores de hidrogênio e uma pequena quantidade de doadores de hidrogênio (NASCIMENTO E.C.M, MARTINS, J.B.L.; 2011). Os compostos têm entre 0 e 2 doadores de

hidrogênio, entre 2-5 aceptores, 3,28-5,08 para consenso Log P e entre 5132,67-78,49 Å² de área de topologia polar (TPSA) (Tabela 5). Na série de pirazolinas investigadas, os compostos estão muito próximos a esta idealidade.

Tabela 5: Segundo conjunto de propriedades físico-químicas das pirazolinas (1a-1i e 2a-2i) e dos medicamentos anticolinesterasico.

Composto	Num.de receptores deligação de H	Num.de doadores de ligação H	Refratividade Molar	TPSA(Å ²)	Consenso de Log Po/w
1^a	2	0	112,7	32.67	4.19
1b	4	0	121.9	78.49	3.46
1c	4	0	121.29	78.49	3.44
1d	4	0	121.29	78.49	3.43
1e	4	1	119.43	69.97	3.74
1f	4	0	125.45	51.13	4.17
1g	4	0	125.45	51.13	4.14
1h	4	0	118.53	51.13	4.01
1i	2	0	129.97	32.67	5.07
2^a	2	0	117.43	32.67	4.52
2b	4	0	121.29	78.49	3.28
2c	2	0	120.17	32.67	4.79
2d	5	0	131.94	60.36	4.12
2e	4	0	125.45	51.13	4.14
2f	4	0	125.45	51.13	4.17
2g	4	0	118.53	51.13	4.02
2h	2	0	129.97	32.67	5.06
2i	2	0	129.97	32.67	5.08
Donepezila	4	0	115.31	38.77	4.00
Galantamina	4	1	84.05	41.93	1.92
Rivastigmina	2	2	85.90	46.01	0.64
Tacrina	2	2	85.90	46.01	0.64

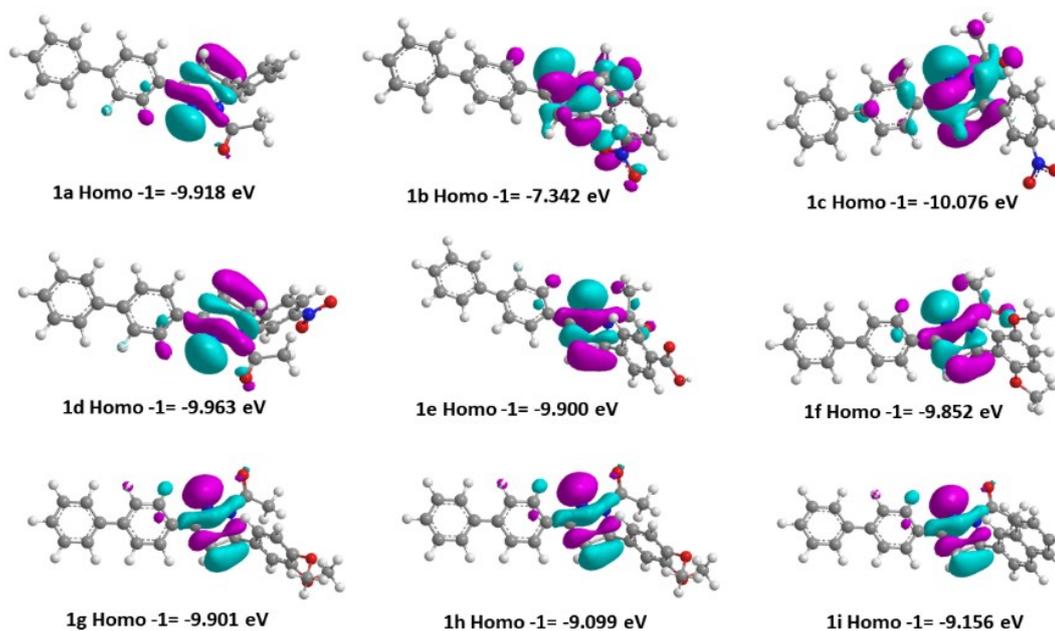
Fonte: Elaborado pela autora.

A abreviação (Num) na tabela acima, foi usada para substituir a palavra número.

Todos os compostos neste trabalho têm 0 alertas para Pains (interferentes em ensaios biológicos) e os compostos **1a-1h**, **2b**, **2d-2g** respeitam todas as regras de Lipinski (Regra de cinco). Todos os compostos atendem aos critérios de Veber quanto ao número de ligações giratórias e restrições de área topológica (<140 Å²). Outra característica comum dos inibidores de acetilcolinesterase é ter uma energia orbital HOMO-1 entre -8,60 e -6,00 eV (NASCIMENTO E.C.M, MARTINS J.B.L.; 2011).

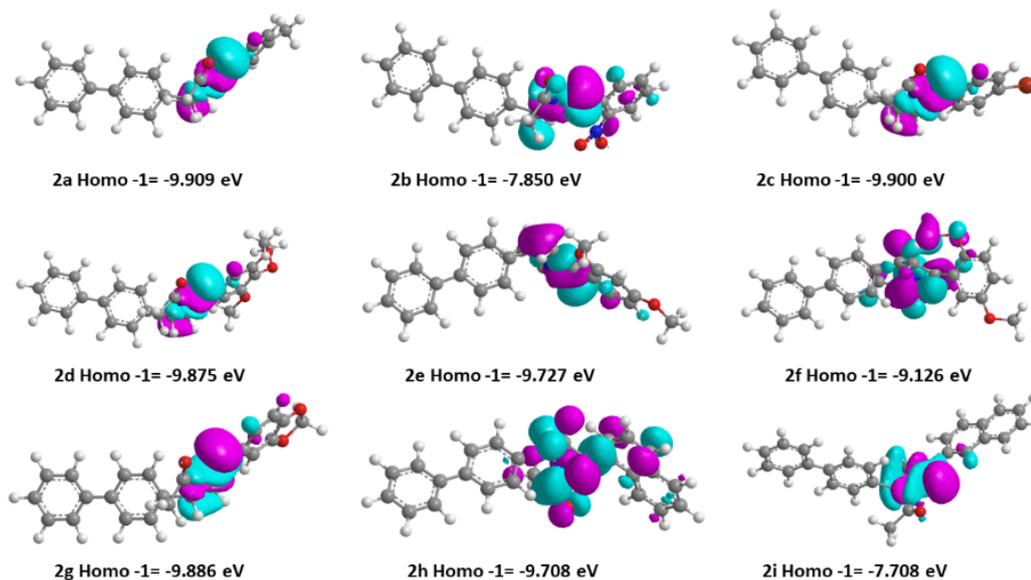
Para as pirazolinas em análise, os dados para o orbital HOMO-1, obtidos através do B3LYP/6-31+G(d,p), (Figura 16), estão de acordo com os valores observados na literatura, os compostos **1b**, **2b** e **2i** (Figura 17), que mostraram maior atividade de inibição de AChE e valores para HOMO-1 na faixa descrita por Nascimento et al. 2011.

Figura 16. Superfície HOMO-1 e energias para **1a-1i**. Aqua representa contribuições positivas e fúcsia representa contribuições negativas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17. Superfície HOMO-1 e energias para **2a-2i**. Aqua representa contribuições positivas e fúcsia representa contribuições negativas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Podemos observar que a superfície que contribui na atividade é a superfície que acontece a substituição nos compostos. Quanto maior for a energia do Homo, mais será sua capacidade de doar elétrons.

A capacidade dos compostos sintetizados de atravessar as membranas gastrointestinais foi avaliada em um modelo PAMPA (Tabela 6).

A pirazolina **2b** apresentou o melhor resultado de permeabilidade, com uma permeabilidade aparente (P_{app}) de $1,22 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ e um retenção de membrana (MR) de 6,6%, seguido pelo composto **2e** (P_{app} de $301,00 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ e MR de 18,4%). O composto **2e** (miLogP de 4,76) era mais lipofílico do que o composto **2b** (miLogP de 4,63), sugerindo que ela tem uma chance maior de ser retida na membrana.

Tabela 6: Permeabilidade aparente (P_{app}) e retenção de membrana (MR) de pirazolinas **1a-i** e **2a-i** em uma membrana artificial paralela modelo de permeabilidade do ensaio de permeabilidade-gastrointestinal do trato.

<u>Composto</u>	<u>P_{app} (cm s⁻¹)</u>	<u>MR (%)</u>
1a	9.15×10^{-6}	30.7
1b	6.90×10^{-6}	47.6
1c	9.42×10^{-6}	27.7
1d	7.85×10^{-6}	32.6
1e	2.13×10^{-8}	15.0
1f	6.94×10^{-6}	38.3
1g	9.02×10^{-6}	9.2
1h	8.75×10^{-6}	33.7
1i	3.36×10^{-6}	59.7
2^a	4.27×10^{-6}	44.3
2b	1.22×10^{-5}	6.6
2c	4.90×10^{-6}	49.0
2d	7.89×10^{-6}	9.5
2e	1.00×10^{-5}	18.4
2f	6.87×10^{-6}	36.2
2g	8.44×10^{-6}	17.0
2h	5.47×10^{-6}	35.8
2i	4.43×10^{-6}	56.9

Fonte: Elaborado pela autora.

A presença de um substituinte elétron retirador (grupo nitro) na pirazolina **2b** é provavelmente associada à sua maior permeabilidade em comparação com o de outros compostos com substitutos doadores de elétrons, tais como **2a** e **2d-f** contendo grupos metil e metoxi. Os resultados da permeabilidade das pirazolinas **2d** (P_{app} de $7,89 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹), **2e** (P_{app} de $1,00 \times 10^{-5}$ cm s⁻¹), e **2f** (P_{app} de $6,87 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹) mostram que o número e a posição dos grupos metoxil no anel aromático também influenciam a permeabilidade. Embora os compostos **2e** e **2f** apresentem o mesmo valor de miLogP (4,76), **2e** mostrou melhor permeabilidade e menor retenção de membrana.

As pirazolinas **2h** e **2i** são compostos por substituintes naftila e seus valores de P_{app} foram mais baixos do que as de **2b**. Tais resultados podem ser atribuídos à maior lipofilicidade do **2h** e do **2i**. Como o observado para as pirazolinas **2a-i**, entre os

compostos **1a-i**, **1c** (que contém um grupo nitro) teve o maior valor de permeabilidade (P_{app} de $9,42 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Entretanto, é possível observar que a posição do grupo nitro influenciou a permeabilidade, já que os compostos **1b** e **1d** não mostram a mesma permeabilidade que o composto **1c**. O composto **1a** mostrou o segundo maior valor de permeabilidade (P_{app} de $9,15 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). A pirazolina **1g** (P_{app} de $9,02 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) também mostrou boa permeabilidade, e, por causa das posições dos grupos metoxi, tinha uma permeabilidade melhor do que o composto **1f** (P_{app} de $6,94 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$).

De todos os compostos testados, pirazolina **1e** (P_{app} de $2,13 \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$) tinha a menor permeabilidade, que pode estar relacionada com a presença de um grupo carboxil.

Além dos testes mencionados anteriormente, foi realizado um estudo comparativo com o perfil ADMET do composto mais ativo (**2b**) e a donepezila, o fármaco de referência para o tratamento da DA, para os quais os resultados podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros farmacocinéticos para **2b** e donepezila.

Compostos			
Propriedade	Nome modelo	2b	Donepezila
	Solubilidade em água (log mol/L)	-6.521	-4.495
	Permeabilidade Caco-2 (log P_{app} em 10^{-6} cm/s)	0.336	1.584
	Absorção Intestinal – humana (%Absorvida)	93.487	94.775
Absorção	permeabilidade da pele (logKp)	-2.731	-2.9
	Substrato de glicoproteína-P	Sim	Sim
	Inibidor de glicoproteína-P I	Sim	Sim
	Inibidor glicoproteína-P II	Sim	Sim
	VSVD Humana (log L/kg)	0.043	0.938
Distribuição	Permeabilidade da barreira hematoencefálica (logBB)	-0.453	0.428
	Permeabilidade do sistema nervoso central SNC (log PS)	-1.646	-1.466
	substrato CYP2D6	Não	Não
	substrato CYP3A4	Sim	Sim

	Inibidor CYP1A2	Sim	Não
Metabolismo			
	Inibidor CYP2C19	Sim	Não
	Inibidor CYP2C9	Sim	Não
	Inibidor CYP3A4	Sim	Não
	Total Clearance (log mL/min/kg)	0.671	1.008
	Excreção		
	Substrato renal OCT2	Não	Sim
	Toxicidade AMES	Sim	Não
	Dose humana máxima tolerada (log mg/kg/dia)	0.386	-0.036
	Inibidor hERG I	Não	Não
	Inibidor hERG II	Sim	Sim
	LD50 toxicidade Oral crônica de ratos LD50 (mol/kg)	2.722	2.999
	Toxicidade		
	Toxicidade Crônica de Rato Oral (log mg/kg pb/dia)	0.808	1.514
	Hepatotoxicidade	Sim	Não
	Sensibilização da pele	Não	Não
	Toxicidade T pyriformis (log µg/L)	0.323	0.526
	Toxicidade de minhocas (log mM)	-2.027	-2.194

Fonte: Elaborado pela autora.

Os dois compostos têm algumas propriedades em comum, por exemplo, são provavelmente substratos de glicoproteína P, um importante barreira biológica contra toxinas e xenobióticos nas células, e inibidores de glicoproteína P I e II, ou seja, eles podem ser transportados por ela.

Ambos têm alta permeabilidade a CaCO_2 ($\log P_{app} > 0,90$), o que significa que o potencial de absorção desses dois compostos por via oral é alto. Além disso, ambos têm permeabilidade relativamente baixa da pele, o que ocorre quando o $\log K_p > -2,5$.

Donepezil tem um alto volume de distribuição em estado estável (DVss) ($\log DV_{ss} > 0,45$), enquanto **2b** é intermediário ($\log DV_{ss}$ entre $-0,15$ e $0,45$). O composto 2b, assim como a donepezila, pode penetrar no sistema nervoso central, já que ambos têm um $\log PS > -2$.

Ambos os compostos podem atuar como substrato e ser metabolizados pelas isoformas CYP2D5 e CYP3A4 do citocromo P450, porém, diferem em termos de inibição ou não das 5 isoformas deste citocromo, o que pode influenciar os parâmetros de interação e toxicidade.

Em referência aos parâmetros de excreção, é improvável que **2b** seja um substrato renal OCT2. O composto **2b** tem uma liberação de droga ou Clearance total inferior à referência, o que indica que o composto **2b** permanece no corpo por um tempo mais longo. Com relação à toxicidade, o **2b** mostra sinal positivo para o teste AMES, o que indica o potencial mutagênico e conseqüentemente carcinogênico.

Todavia, o mesmo composto tem uma dose máxima tolerada mais alta recomendada. Apesar de seu potencial promissor resultado de atividade enzimática, o composto **2b** precisa de ajustes estruturais que permitam a otimização de seus parâmetros farmacocinéticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PIRAZOLINAS **1a-i** e **2a-i**

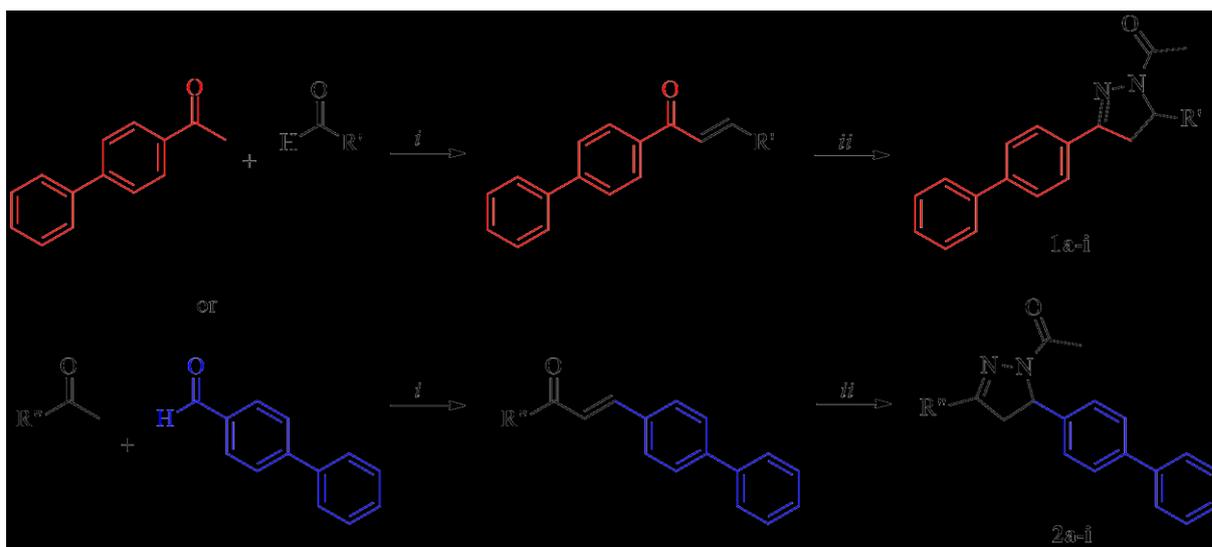
Todos os reagentes foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich), e todos os solventes foram de qualidade analítica e utilizados sem purificação. Para obter pirazolininas, primeiramente foram sintetizadas as chalconas precursoras por condensação de Claisen-Schmidt de diferentes benzaldeídos com p-fenilacetofenona. Acetofenona (5 mmol) e benzaldeído (5 mmol) foram adicionados a um balão reacional de fundo redondo contendo 20 mL de etanol. A mistura foi mantida sob agitação magnética e 20 a 30 gotas de 50% (p/v) hidróxido de sódio foram adicionados.

Em seguida, a reação foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. Após este período, a mistura da reação foi despejada em água destilada e neutralizada com 10% (v/v) de ácido clorídrico. A chalcona foi recuperada como um precipitado por filtragem a vácuo (BORCHHARDT, D. M.; MASCARELLO, A. CHIARADIA, L. D.; et al.; 2010).

Para isto, a um balão contendo ácido acético (1mmol), foram adicionados a chalcona (1 mmol) e hidrazina (3 mmol) e a mistura ficou sob refluxo por 6h. Após esse período, a reação foi derramada no gelo, e o precipitado foi filtrado em vácuo. O

produto foi purificado por recristalização usando o etanol como solvente (NEPALI, K.; KADIAN, K.; OJHA, R. et al.; 2012).

Figura 18. Síntese de chalconas intermediários e pirazolinas 1a-i e 2a-i.
Reagentes e condições: (i) etanol, hidróxido de sódio, r.t.; (ii) hidrazina, ácido acético, refluxo.



Fonte: Elaborado pela autora.

As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada fina utilizando placas de alumínio revestidas com sílica gel. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR)¹H e ¹³C e determinou-se o ponto de fusão. Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Microquímica MGAPF-301. Os espectros de ¹H e ¹³C NMR foram registrados em um espectrômetro Bruker Ac-200F (operando em 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C) ou em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 (operando em 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C) usando tetrametilsilano como padrão interno. As estruturas foram confirmadas por espectrometria de massa. Os espectros de massa de alta resolução (HRMS) foram registrados em um espectrômetro de massa micrOTOF-QII (Bruker Daltonics), equipado com uma bomba de seringa automática (KD Scientific) para injeção de amostras (fluxo constante de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$) em modo positivo de ionização de eletrospray (ESI) (4,5 kV e 180 °C) usando como solvente acetonitrila..

O instrumento foi calibrado na faixa m/z de 50 a 3000 usando uma solução de mistura de ajuste de baixa concentração (Agilent Technologies). Os dados foram processados utilizando o software Bruker Data Analysis versão 4.0. Quando as

massas calculadas e experimentais foram comparadas, o erro estava dentro de 2 ppm.

4.2 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE

A inibição enzimática foi medida usando o método descrito anteriormente (OLIVEIRA, A.S.; et al.; 2019). Resumidamente, 90 μL de 50 mmol L^{-1} tampão Tris-HCl pH 8,0, 30 μL de uma solução tampão contendo o composto (0,1 mg mL^{-1}) dissolvido em MeOH e 15 μL de uma solução AChE contendo 0,25 U mL^{-1} , dissolvido em 50 mmol L^{-1} tampão Tris-HCl pH 8, contendo 0,1% de albumina de soro bovino foram incubados por 15 min. Em seguida, 25 μL de uma solução de iodeto de acetiltiocolina (15 mmol em água) e 140 μL de reagente de Ellman (3 mmol L^{-1} em tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,1 mol L^{-1} NaCl e 0,02 mol L^{-1} MgCl_2) foram adicionados, e a mistura final foi incubada por mais 30 min a 28 C. A absorvância da mistura foi medida a 405 nm. O mesmo solvente no qual a amostra foi dissolvida, considerado 100% de atividade AChE, foi utilizado como controle negativo. A inibição (%) foi calculada da aplicação da equação 2, na qual A_{sample} é a absorvância da amostra e A_{control} é a absorvância sem a amostra: $I (\%) = (100 - A_{\text{amostra}}/A_{\text{control}}) \cdot 100$ (Equação 2)

4.3 ENSAIOS DE PERMEABILIDADE DE MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA)

O PAMPA foi realizado de acordo com um método previamente descrito (VENZKE, D.; CARVALHO, F.K.; RUANI, A.P. et al.; 2013). Os filtros de uma placa filtrante de 96 poços foram revestidos com 10 μL de uma solução de 1% (p/v) de dodecano de fosfatidilcolina para imitar a permeação através do trato gastrointestinal. Soluções doadoras de compostos 1a-i e 2a-i foram preparados diluindo as soluções de estoque de DMSO (1000 ppm) em 50% (v/v) de solução tampão fosfato salina e agitando da noite para o dia.

Em seguida, 150 μL de solução doadora foram adicionados aos poços das placas filtrantes e 300 μL de solução aceitante (50% DMSO em tampão fosfato salino) foi adicionado aos poços da placa receptora. A placa de filtro foi acoplada à placa receptora, e as amostras foram incubados no escuro por 5 h sob agitação e depois

por mais 20 min à temperatura ambiente. Enquanto isso, 150 µL de solução doadora foi adicionado a 300 µL de solução aceitante para obter as respectivas soluções de equilíbrio. Após a incubação, a placa filtrante, o receptor e as soluções de equilíbrio foram analisados por cromatografia líquida de alto desempenho com detecção de matriz de diodos. As experiências foram realizadas em quadruplicata.

A permeabilidade aparente (P_{app}) foi calculada usando Eq. (3) (WOHNSLANF, F. FALLER, B. 2001).

$$P_{app} = \frac{V_d \times V_a}{(V_d + V_a) \times A \times t} \times \ln(1 - r) \quad (3)$$

Onde V_d é o volume do poço doador (cm^3), V_a é o volume do poço receptor (cm^3), A é a área da membrana (cm^2), t é o tempo de incubação (s), e r é a razão entre a concentração da solução doador e a concentração da solução de equilíbrio. A retenção de membranas (MR) foi calculada pela seguinte equação (Eq. 4):

$$(C_e - C_a + C_d) MR = \frac{\quad}{C_e} \times 100 \quad (4)$$

Onde C_e é a concentração composta na solução de equilíbrio, C_a é a concentração composta no poço do aceitador, e C_d é a concentração composta no poço doador.

4.4 ESTUDOS COMPUTACIONAIS

4.4.1 DOCAGEM MOLECULAR

Simulações de ancoragem molecular foram realizadas com GOLD (JONES, G.; et al. 1997) v.2020.2.0 e a função escolhida foi ChemPLP (KORBO, STUTZLE T, EXNER T.E; 2009). Foi utilizada a acetilcolinesterase humana (PDB 4M0E, 2,00 Å) (CHEUNG, J. et al.; 2013). A partir de então, os componentes foram tratados como rígidos, e os compostos foram tratados como totalmente flexíveis. A preparação dos receptores foi feita dentro da suíte GOLD. Nenhuma molécula de água cristalográfica

foi considerada. O local de ligação foi definido como todos os átomos receptores até 6 Å do inibidor cristalográfico de referência.

Pelo menos 10 poses foram geradas para cada ligante, usando os parâmetros padrão do algoritmo genético. Para análise, foram selecionadas as conformações de pontuação máxima dos conjuntos de postes/ligandos mais populosos.

As cargas atômicas foram atribuídas com Ammp-Mom no VEGAS (PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G.; 2004) ZZ v.3.2. Os mapas de propensão foram gerados com superstar, um módulo para geração de farmacóforos baseados no conhecimento e previsão das interações intermoleculares disponíveis dentro da suíte GOLD.

Trabalhamos com os parâmetros padrão para detecção de cavidades e os dados PDB, permitindo a rotação R-H e [O, N, S]-H. A figura do mapa de propensão foi gerada com Hermes v.1.10.5 (também disponível dentro da suíte GOLD). As figuras do receptor-ligante foram geradas com PyMOL (DELANO, W.L.; 2002) v.1.8.

4.4.2 ESTUDOS QUÂNTICOS

Otimização da estrutura molecular e frequências harmônicas vibracionais foram calculadas usando o DFT no pacote do programa Gaussian v.09 com nível B3LYP e conjuntos de base 6-311++G(d,p) (NAGESWARI, G.; et al. 2018).

4.4.3 DENSIDADE DE KERNEL

Os mapas de densidade de Kernel foram obtidos a partir do programa ORIGIN (ORIGIN, 2020) 2021b.

4.4.4 PREVISÃO DA *IN SILICO* DO PERFIL FARMACOCINÉTICO

A estrutura dos compostos foi desenhada usando o software ChemDraw (versão Ultra 12.0, PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, EUA) e foi convertida em um único arquivo de banco de dados SMILES. A previsão *in silico* dos dados de farmacocinética foi feita utilizando o SwissADME (DAIANA A., MICHIELIN O, ZOETE V.; 2017).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do IC₅₀ foram obtidos a partir de uma curva de ajuste de regressão não-linear de log de concentração versus resposta normalizada. Os valores foram expressos como média ± S.D. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism® versão 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ por análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste Mann-Whitney.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

O composto **2b** apresentou uma alta taxa de inibição de AChE e um bom perfil farmacocinético. Estudos complementares envolvendo alterações no esqueleto carbônico para manter a atividade inibitória e diminuir possíveis efeitos tóxicos serão realizados.

6 CONCLUSÃO

Nessa dissertação, relatamos uma série de pirazolininas como uma nova classe de inibidores da AChE, um alvo validado para obtenção de possíveis candidatos ao tratamento quimioterápico da DA. Após estudos abrangentes de design de fármacos com base na estrutura e estudos de relação estrutura-atividade, uma série de pirazolininas foi identificada como novos inibidores da AChE. Ficou evidente que o composto **2b** é um bom candidato para inibição da AchE e apresenta parâmetros promissores para persistir na sua investigação. Estes compostos fáceis de sintetizar representam novos quimiotipos para a concepção de novos compostos para a terapia da DA. Os resultados obtidos nos testes *in vitro* foram racionalizados por docagem molecular, estudos DFT e análises ADMET. Por fim, esses resultados avançam nosso conhecimento sobre o modo não covalente de inibição desse alvo molecular terapeuticamente relevante, construindo bases sólidas para a descoberta de medicamentos e abrindo novas oportunidades de pesquisa nessa área sensível da saúde humana.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, K. R.; ELSHEMY, H. A.; AZOZ, A. A. 1-(4-Methane(amino)sulfonylphenyl)-3-(4-substituted-phenyl)-5-(4-trifluoromethylphenyl)-1H-2-pyrazolines/pyrazoles as potential anti-inflammatory agentes. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26398140/>. Acesso em 12 de março de 2023.
- ALLEN, J. R.; LOYD, V.; POPOVICH, N. G. ANSEL, H. C., Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos, 9ª ed., Porto Alegre: Artmed Editora. cap 5, 2013.
- ALMEIDA, J. R. Planejamento, ensaio e otimização *in silico* de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase. 2014. 156f. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16758486/>. Acesso em 12 de março de 2023.
- AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/RjQfwssPJHvcBBnzpfJxXYh/?lang=pt>. Acesso em 12 de março de 2023.
- AMARAL, A. T.; HORTA, C.; KUMMERLE, A. E.; GUIDO, R. V. C. A EVOLUÇÃO DA QUÍMICA MEDICINAL NO BRASIL: AVANÇOS NOS 40 ANOS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/4VfxtNHmHmpPZnkNYXzYbZK/?lang=pt>. Acesso em 12 de março de 2023.
- ANDERSON, A. C. The process of structure-based drug design. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14522049/>. Acesso em 12 de março de 2023.
- ARAÚJO, C.; ROBERTA, M.; SANTOS, V.; GONSALVES, L. A.; Arlan A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. Disponível em: <https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v8n6a04.pdf>. Acesso em 12 de março de 2023.
- ARROIO, A.; HONORIO, K. M.; SILVA, A. B. F. DA. Propriedades químico- quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.
- RANG, E. J.; FRAGA, C. A. M. Em Química Medicinal as Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, 3a ed., Artmed: Porto Alegre, cap. 1. 2015.
- BARRET, R.; Lipinski's Rule of Five. In: Therapeutical Chemistry, 2018.

BAZZINI, P.; WERMUTH, C. G. In *The Practice of Medicinal Chemistry*; Academic Press: San diego, 2008.

BORCHARDR, D. M.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L. D.; et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *trypanosoma cruzi*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2010.

BURKE, K. A.; YATES, E. A.; LEGLEITER, J. Biophysical insights into how surfaces, including lipid membranes, modulate protein aggregation related to neurodegeneration. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2013.00017/full>. Acesso em 12 de março de 2023.

BRENK, R.; SCHIPANI, A.; JAMES, D.; KRASOWSKI, A.; GILBERT, I. H.; FREARSON, J.; WYATT, P. G. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18064617/>. Acesso em 12 de março de 2023.

CONTRERAS, R.; DOMINGO, L. R.; ANDRES, J.; PEREZ, P.; TAPIA, O. J. *Phys. Chem*, v. 103, 1367, 1999.

CHANDRA, T. E. A. Synthesis of substituted acridinyl pyrazoline derivatives and their evaluation for anti- 87 inflammatory activity. *Europ J. of Med. Chem*, v. 45, n. 5, p. 1772-1776. 37, 2010.

CHEN, M. L.; YU, L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. *Molecular Pharmaceutics*, v.6, n.1, p.74-81, 2009.

CHEN, X. Q.; MOBLEY, W. C. Alzheimer disease pathogenesis: Insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A β and tau species. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31293377/>. Acesso em 12 de março de 2023.

CHEUNG, J.; GARY, E. N.; SHIOMI, K.; ROSENBERRY, T. L. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone i and territrem B show peripheral site flexibility. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24900610/>. Acesso em 12 de março de 2023.

CHOUTER, M. I.; BOULEBD, H.; PEREIRA, D. M. et al. New chalcone-type compounds and 2-pyrazoline derivatives: Synthesis and caspase-dependent anticancer activity. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32100558/>. Acesso em 12 de março de 2023.

CENINI, G.; DOWLING, A. L. S.; BECKETT, T. L. et al. Association between frontal cortex oxidative damage and beta-amyloid as a function of age in Down syndrome. *Biochim. Biophys.* Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22009041/>. Acesso em 12 de março de 2023.

DAIANA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V.; SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small

molecules. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep42717>. Acesso em 12 de março de 2023.

DELANO, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. Disponível em: https://legacy.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter40/11_pymol.pdf. Acesso em 12 de março de 2023.

OLIVEIRA, A. S.; MEIER, L.; ZAPP, E.; BRONDANI, D.; BRIGHENTE, I. M. C.; SA, M.M. Functionalized dienes: A new series of potential agents for the treatment of Alzheimer's disease. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/dmrg5PFc8HCsPWRZn48m6Tb/?lang=en>. Acesso em 12 de março de 2023.

DE OLIVEIRA, A. S.; MELLO, L. D. S.; OGIHARA, C. H. et al. Diaminomaleonitrile derivatives as new potential antichagasic compounds: A study of structure-activity relationships. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34708659/>. Acesso em 13 de março de 2023.

DIAS, R.; DE AZEVEDO, W. F. Molecular docking algorithms. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19128213/>. Acesso em 12 de março de 2023.

DI, L.; KERNS, E. H. Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization. Elsevier: Amsterdam, 2015.

EDDERSHAW, P. J.; BERESFORD, A. P.; BAYLISS, M. K. ADME/PK as part of a rational approach to drug Discovery. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10931658/>. Acesso em 13 de março de 2023.

FAPESP. Pesquisadores avaliam metodologia inédita capaz de acelerar descoberta de novos fármacos, 2023. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/pesquisadores-avaliam-metodologia-inedita-capaz-de-acelerar-descoberta-de-novos-farmacos/40818/#:~:text=Estima%2Dse%20que%2C%20hoje%2C>. Acesso em: 22 mar. 2023.

FERNANDEZ, M.; CABALLERO, J. J. Molecular Modeling: Origin, Fundamental Concepts and Applications Using Structure-Activity Relationship and Quantitative Structure-Activity Relationship. Disponível em: <https://www2.unifap.br/bionorte/files/2019/03/05.Molecular-Modeling-Origin-Fundamental-Concepts-and-Applications-Using-Structure-Activity-Relationship-and-Quantitative-Structure-Activity-Relationship.pdf>. Acesso em 13 de março de 2023.

FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T. A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPSKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S. J. How Important is to Account for Water When Modeling Biomolecular Complexes? Disponível em: <http://www.sciepub.com/reference/131948>. Acesso em 13 de março de 2023.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. Foye's principles of medicinal chemistry, Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

HANE, F.; TRAN, G.; ATTWOOD, S. J.; LEONENKO, Z. Cu²⁺ Affects Amyloid- β (1–42) Aggregation by Increasing Peptide-Peptide Binding Forces. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059005>. Acesso em 13 de março de 2023.

HALGREN, T. A.; MURPHY, R. B.; FRIESNER, R. A.; BEARD, H. S.; FRYE, L. L.; POLLARD, W. T.; BANKS, J. L. J. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15027866/>. Acesso em 13 de março de 2023.

HALAMODA- KENZAOU, B. et al. Mapping of the available standards against the regulatory needs for nanomedicines. In Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wnan.1531>. Acesso em: 12 março de 2023.

HAYDEN, E. Y.; TELOW, D. B.; DREZGA, A. et al. review-Amyloid β -protein oligomers and Alzheimer's disease. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24289820/>. Acesso em 14 de março de 2023.

HARIKRISHNA, N.; ISLOOR, A. M.; ANANDA, K.; OBAID, A.; FUN, H. K.; Synthesis, and antitubercular and antimicrobial activity of 1'-(4-chlorophenyl) pyrazole containing 3,5-disubstituted pyrazoline derivatives. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/nj/c5nj02237a>. Acesso em 14 de março de 2023.

HEATON, C. A.; MILLER, A. K.; POWELL, R. L. Predicting the reactivity of fluorinated compounds with copper using semi-empirical calculations. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022113900003249>. Acesso em 14 de março de 2023.

HOLLIDAY, J. D.; KANOULAS, E.; MALIM, N.; WILLET, P. Multiple Search methods for similarity-based virtual screening: analysis of search overlap and precision. *J. of Chem*, v.3, 2011.

HONORIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. An AM1 study on the electron-donating and electron-accepting character of biomolecules. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/qua.10661>. Acesso em 14 de março de 2023.

HUANG, J. Doença de Alzheimer. *Msd manuals*. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/dist%C3%BArbiopsiquiatria/neurologia/delirium-e-dem%C3%A2ncia/doen%C3%A7a-de-alzheimer>. Acesso em 14 de março de 2023.

IBRAHIM, M. M.; GABR, M. T. Estratégias terapêuticas para o mal de Alzheimer. *Regen. neural. Res.* 14(3), 437–440. 2019. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30539809>. Acesso em 15 de março de 2023.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. J. Chem. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15667143/>. Acesso em 15 de março de 2023.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. J. Mol. Biol. 1997.

KARABACAK, M.; ALTINTOP, M. D. et al. Synthesis and evaluation of new pyrazoline derivatives as potential anticancer agents. Molecules. 20 (10), 2015.

KARTHIKEYA, M. S.; HOLLA, B. S.; KUMARI, N. S. Synthesis and antimicrobial studies on novel chloro-fluorine containing hydroxy pyrazolines. Europ. J. of Med. Chem, v. 42, n. 1, p. 30-36, 2007.

KAYED, R.; SOKOLOV, Y.; EDMONDS, B.; MCLNTIRE, T. M.; MILTON, S. C.; HALL, J. E.; GLABE, C. G. J. Multiscale modeling of biomolecular aggregation and protein-membrane interactions in amyloid diseases. Disponível em: <https://www.cecam.org/workshop-details/343>. Acesso em 15 de março de 2023.

KNOPMAN, D. S.; AMIEVA, H.; PETERSEN, R. C. et al. Alzheimer disease. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33986301/>. Acesso em 15 de março de 2023.

KHAN, S. A.; ASIRI, A. M.; KUMAR, S.; SHARMA, K. Green synthesis, antibacterial activity and computational study of pyrazoline and pyrimidine derivatives from 3-(3,4-dimethoxy-phenyl-1-(2,5-dimethyl-thiophen-3-yl)-propenone. Disponível em: <https://www.eurjchem.com/index.php/eurjchem/article/view/789>. Acesso em 14 de março de 2023.

KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T.E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with Plants. J. Chem. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19125657/>. Acesso em 16 de março de 2023.

KLYUBIN, I.; FADEEVE, J. V.; CULLEN, W. K.; ANWYL, R.; WOLFE, M. S.; ROWAN, M. J.; SELKOE, D. J.; Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932745/>. Acesso em 15 de março de 2023.

KUBINYI, H. J. QSAR: A ABORDAGEM DE HANSCH. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/GzGGqkKzC6m9p968RCCxRyL/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em 16 de março de 2023.

KUMAR, P.; KUMAR, S.; HUSAIN, K.; KUMAR, A. An efficient synthesis of pyrazole chalcones under solvent free conditions at room temperature. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51987199_ChemInform_Abstract_An_Efficient_Synthesis_of_Pyrazole_Chalcones_under_Solvent-Free_Conditions_at_Room_Temperature. Acesso em 16 de março de 2023.

LEE, J.; CULYBA, E. K.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21804535/>. Acesso em 18 de março de 2023.

LEESON, P. Drug discovery: Chemical beauty contest. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22281594/>. Acesso em 18 de março de 2023.

LEITÃO, A.; MONATNARI, C. A.; DONNICI, C. L. Sobre o uso de métodos quimiométricos em química combinatória. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 178–184, abr. 2000.

LEVAI, A.; SILVA, A. M. S.; PINTO, D. C. G. A. et al. Synthesis of pyrazolyl-2-pyrazolines by treatment of 3-(3-aryl-3-oxopropenyl) chromen-4-ones with hydrazine and their oxidation to bis(pyrazoles). *European J. Org. Chem.* (22), 2004.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/230057738_Synthesis_of_Pyrazolyl-2-pyrazolines_by_Treatment_of_3-3-Aryl-3-oxopropenylchromen-4-ones_with_Hydrazine_and_Their_Oxidation_to_Bispyrazoles. Acesso em 18 de março de 2023.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* v.3, 46, 2001.

LUMLEY, J. A. QSAR Comb. Sci. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/qsar.200520136>. Acesso em 18 de março de 2023.

LUZARDO, A. R.; GORINI, M. I. P. C.; SILVA, A. P. S. S.; da. (2006, out.-dez.). Características de idosos com Doença de Alzheimer e seus cuidadores: uma série de casos em um serviço de neurogeriatria. Florianópolis (SC): *Revista Texto Contexto Enfermagem*, 15(4), 587-594. 2006.

LYNCH, S. S. Desenvolvimento de fármacos. 2022. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/farmacologia-cl%C3%ADnica/conceitos-em-farmacoterapia/desenvolvimento-de-f%C3%A1rmacos>. Acesso em: 22 março de 2023.

MACHADO, V.; CENCI, A.; TEIXEIRA, K. F.; SENS, L.; TIZZIANI, T.; NUNES, R. J.; FERREIRA, L.G.; YUNES, R. A.; SANDJO, L. P.; ANDRICOPULO, A. D.; DE OLIVEIRA, A. S. Pyrazolines as potential anti-Alzheimer's agents: DFT, molecular docking, enzyme inhibition and pharmacokinetic studies. *Rsc Medicinal Chemistry*, v. 1, p. 1, 2022.

MANGIALAXHE, F.; SOLOMON, A.; WINBLAD, B.; MECOCCHI, P.; KIVIPELTO, M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet. Neurol.* 9(7), 702–716, 2010.

MATHEW, B.; SURESCH, J.; ANBAZHAGAN, S.; MATHEW, G. Pyrazoline: A Promising Scaffold for the Inhibition of Monoamine Oxidase. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 13(3), 2014.

MANTZANIDOU, M.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU- LITINA, D. Pyrazoles and pyrazolines as anti-inflammatory agents. *Molecules*. 26(11), 2021.

MIGNANI, S.; RODRIGUES, J.; TOMAS, H.; JALAL, R.; SINGH, P. P.; MAJORAL, J. P.; VISWAKARMA, R. A. *Drug Discovery Today*, 23, 605, 2018.

MOREIRA, M.; VIANNA, M. S. O espectro clínico e laboratorial da doença de Alzheimer: Uma perspectiva neurológica. *Revista Psicologia em Pesquisa*, v. 14, n. 3, p. 83–110, 2020.

NASCIMENTO, E. C. M.; MARTINS, J. B. L. Electronic structure and PCA analysis of covalent and non-covalent acetylcholinesterase inhibitors. *J. Mol. Model.* 17(6) 2011.

NAGESWARI, G.; GEORGE, G.; RAMALINGAM, S., GOVINDARAJAN, M. Electronic and vibrational spectroscopic (FT-IR and FT-Raman) investigation using ab initio (HF) and DFT (B3LYP and B3PW91) and HOMO/LUMO/MEP analysis on the structure of L-serine methyl ester hydrogen chloride. *J. Mol. Struct.* 2018.

NAWAZ, F.; ALAM, O.; PERWEZ, A. et al. 3'-(4-(Benzyloxy)phenyl)-1'-phenyl- 5-(heteroaryl/aryl)-3,4-dihydro-1'H,2H-[3,4'-bipyrazole]-2-carboxamides as EGFR kinase inhibitors: Synthesis, anticancer evaluation, and molecular docking studies. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 353(4), 2020.

NEPALI, K.; KADIAN, K.; OJHA, R. et al. Effect of ring A and ring B substitution on the cytotoxic potential of pyrazole tethered chalcones. *Med. Chem. Res.* 21(10), 2012.

NEUENFELDT, P. D. Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Derivados Pirazolínicos e Bis-chalconas Simétricas: Estudos de Correlação Estrutura/Atividade. Tese de doutorado Programa de Pós-Graduação em Química Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 355. 2015.

NILSBERTH, C.; WESTLIND- DANIELSSON, A.; ECKMAM, C. B.; CONDRON, M. M.; AXELMAM, K.; FORSELL, C.; STENH, C.; LUTHMAN, J.; TEFLOW, D. B.; YOUNKIN, S. G.; NASLUND J.; LANNFELT, L. *Nat. Neurosci.* 4, 887, 2001.

NISA, S.; YUSULF, M. Synthetic and antimicrobial studies of N-substituted- pyrazoline-based new bisheterocycles. *J. Heterocycl. Chem.* 57(4), 2020.

OLIVEIRA, A. S.; MEIER, L.; ZAPP, E.; BRONDANI, D.; BRIGHENTE, I.M.C.; SA, M.M. Functionalized dienes: A new series of potential agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Braz. Chem. Soc.* 2019.

ORIGIN: Data Analysis and Graphing Software. Orig. Orig. Introd. 2020.

OZDEMIR, A. E. A. Synthesis and antimicrobial activity of 1- (4-aryl-2- thiazolyl)-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-pyrazoline derivatives. *Eur. J. of Med. Chem*, v. 42, n. 3, p. 403-409, 2007.

PATRICK, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, 5th ed., Oxford: Oxford University Press, 2013.

PALASKA, E. E. A. Synthesis and antidepressant activities of some 3,5- diphenyl-2-pyrazolines. *Eur. J. of Med. Chem.*, v. 36, n. 6, p. 539-543, 2001.

PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. VEGA - An open platform to develop chemobio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 18(3), 2004.

PIRES, DE V.; BLUNDELLI, T.L.; ASCHER, D.B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.* 58(9), 4066–4072, 2015. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.

RANG, R.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Rang & Dale Farmacologia, 8ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 8, 2015.

RAUT, D. G.; LAWAND, A. S.; KADU, V. D. et al. Synthesis of Asymmetric Thiazolyl Pyrazolines as a Potential Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents. *Polycycl. Aromat. Compd.* 42(1), 2021.

REIS, J. M. Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA): Investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de fármacos. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.;* DA SILVA, C. H. P. ESTRATÉGIAS de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos | Revista Virtual de Química. 24 dez. 2012. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/295>. Acesso em: 26 fev. 2023.

RODRIGUES, G. et al. O USO DE SOFTWARES LIVRES EM AULA PRÁTICA SOBRE FILTROS MOLECULARES DE BIODISPONIBILIDADE ORAL DE FÁRMACOS. *Química Nova*, 2021.

ROY, K. K.; DIXIT, A.; SAXENA, A. K. An investigation of structurally diverse carbamates for acetylcholinesterase (AChE) inhibition using 3D-QSAR analysis. *J. of Mol. Graphics & Modelling*, v. 27 n. 2, p. 197-208, 2008.

SELKOE, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.*;81(2):741-66, 2001.

SAFAEI-GHOMI, J.; BAMONIRI, A. H.; SOLTANIAN-TELKABADI, M. A modified and convenient method for the preparation of N-phenylpyrazoline derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.* 42(7), 2006.

STUMPFE, D.; BAJORATH, J. Explorando penhascos de atividade em química medicinal. J Med Chem. 2012 Abr 12;55(7):2932-42. DOI: 10.1021/jm201706b. Epub 2012 27 de janeiro. PMID: 22236250.

SWARNKAR, D. E. A. Microwave assisted synthesis of some pyrazole derivatives and their antibacterial and antifungal activity. The Pharma Innovation Journal, v. 3, p. 5-9, 2014.

TAFT, C. A.; DA SILVA, C. H. T. P.; Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics, 1a. ed., Research Singpost: Kerala, 2008.

TALEVI, A.; BRUNO-BLANCH, L. E. Screening Virtual: Una Herramienta Eficaz para el Desarrollo de Nuevos Fármacos en Latinoamérica. Disponível em: http://www.latamjpharm.org/resumenes/28/1/LAJOP_28_1_3_3.pdf. Acesso em 18 de março de 2023.

UNITED STATES. Department of health & Human Services. Food and drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system Rockville: FDA, p.1-13, 2000.

WALSH, D.; SHEPPARD, G. S.; BOUSKA, J. J. Drug Discov. Today: Therapeutic Strategies, 2, 343, 2005.

WANG, Y.; MICHAEL, S.; HUANG, R. et al. Retro Drug Design: From Target Properties to Molecular Structures. bioRxiv Prepr. Serv. Biol. 2021.

WALTERS, W. P.; Exp. Opin. Drug Discovery, 7, 99, 2012. WASZKOWYCZ, B. Drug Discov. Today 2008, 13, 219.

WEBER, K. C.; HONORIO, K. M.; BRUNI, A. T.; ANDRICOPULO, A. D.; DA SILVA, A. B. F.; Struct. Chem. 2006, 17, 307.

WERMUTH, C. G.; The practice of medicinal chemistry; Elsevier/Academic Press, 2008.

WOHNSLAND, F.; FALLER, B.; High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. J. Med. Chem. 44(6), 923–930, 2001.

VEBER, D.F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. J. Med. Chem. 2002.

VENZKE, D.; CARVALHO, F. K.; RUANI, A. P. et al. PAMPA permeability, acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of pyranosylflavones from *Polygala molluginifolia* (Polygalaceae). In: Journal of the Brazilian Chemical Society, 2013.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Proteins. Acoplamento melhorado de ligantes de proteínas usando GOLD. 52, 609. 2003.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Vn59nxpQRHv4ggLsmfhjBSr/?lang=pt>. Acesso em 18 de novembro de 2023.

VIVEKA, S.; DINESHA, SHAMA, P.; NAGARAJA, G. K.; BALLAV, S.; KERKAR, S. Projeto e síntese de algumas novas pirazolininas com potenciais agentes anti-inflamatórios, analgésicos e antibacteriano. Eur. J. Med. Quimioterápico. 2015.