

ANA BEATRIZ SILVA VELLOSA

Estudos computacionais e síntese de potenciais agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (subtipo $\alpha 7$) visando o tratamento da doença de Alzheimer

ANA BEATRIZ SILVA VELLOSA

Estudos computacionais e síntese de potenciais agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (subtipo $\alpha 7$) visando o tratamento da doença de Alzheimer

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Orientador: **Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior**

ARARAQUARA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

V441e Velloso, Ana Beatriz Silva
Estudos computacionais e síntese de potenciais agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (subtipo $\alpha 7$) visando o tratamento da doença de Alzheimer / Ana Beatriz Silva Velloso. – Araraquara: [s.n.], 2021
85 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

1. Doença de Alzheimer. 2. Demência. 3. Química farmacêutica. 4. Síntese orgânica. 5. Receptores nicotínicos. I. Título



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

Estudos computacionais e síntese de potenciais agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (subtipo 7) visando o tratamento da doença de Alzheimer

AUTORA: ANA BEATRIZ SILVA VELLOSA

ORIENTADOR: NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química orgânica / Unesp Campus de Araraquara

Prof. Dr. CARLOS MAURÍCIO RABELLO SANT'ANNA (Participação Virtual)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ - Rio de Janeiro

Prof. Dr. RAFAEL MAFRA DE PAULA DIAS (Participação Virtual)
Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos / Universidade Federal de São João del-Rei - UFSJ - Ouro Branco

Araraquara, 25 de novembro de 2021

DADOS CURRÍCULARES

DADOS PESSOAIS:

Nome: Ana Beatriz Silva Velloso

Nome em citações bibliográficas: VELLOSA, A. B. S.

Nascimento: 03/04/1997

E-mail para contato: biatriz.sv@hotmail.com; ana.vellosa@unesp.br

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6097440509514611>

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Mestrado em Química: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP. Período: fevereiro 2019 – dezembro 2021. Título da dissertação: Estudos computacionais e síntese de potenciais agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (subtipo $\alpha 7$) visando o tratamento da doença de Alzheimer. Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior, Bolsa: CAPES.

Graduação em Licenciatura Química: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, *Campus* Matão/SP. Período: fevereiro 2015 - dezembro 2018.

Formação Complementar:

2021 – 2021 X Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos. Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil.

2020 – 2020 Competências Profissionais, Emocionais e Tecnológicas para Tempos de Mudança. (Carga horária: 4 h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

2020 – 2020 Curso de Farmacologia Básica. (Carga horária: 10 h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

2019 – 2019 Escola de Modelagem Molecular da Unesp. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2019 – 2019 Planejamento de Fármacos Baseado em Fragmentos (FBDD) e Técnicas de Triagem. (Carga horária: 6 h). Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil.

2017 – 2018 Inglês. (Carga horária: 40 h). Cultura Americana, C. A., Brasil.

2017 – 2017 Contém Química: pensar, fazer e aprender pelo método investigativo. (Carga horária: 2 h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP, Brasil.

2015 – 2015 A resolução de problemas como prática em sala de aula. (Carga horária: 3 h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP, Brasil.

2015 – 2015 Bibliotecando com arte (artesanatos diversos). (Carga horária: 3 h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP, Brasil.

2015 – 2015 Construindo seu currículo na plataforma Lattes. (Carga horária: 1 h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP, Brasil.

2015 – 2015 Formatando trabalhos acadêmicos com recursos do Microsoft Word 2007. (Carga horária: 1 h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP, Brasil.

2015 – 2015 Base Nacional Comum e PL 6840 no contexto da reforma do Ensino Médio. (Carga horária: 1 h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP, Brasil.

2013 – 2015 Inglês. (Carga horária: 288 h). CNA, CNA, Brasil.

PREMIOS E TÍTULOS

2019 Prêmio Lavoisier de melhor aluna do curso, Conselho Regional de Química IV região.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

10/2021 – Atual Agente Local de Inovação pelo Sebrae de Araraquara.

03/2018 – 06/2018 Escola Municipal de Ensino Fundamental Gilda Rocha de Mello e Souza, Estágio Supervisionado no Ensino Fundamental II.

03/2017 – 11/2017 Escola Estadual Jardim Buscardi; Estágio Supervisionado no Ensino Médio.

08/2015 – 01/2016 Farmácia Magistral; Estágio remunerado em laboratório de manipulação de medicamentos.

PROJETOS

Pesquisa

2019 – Atual Mestrado Acadêmico. Título: Estudos computacionais e síntese de potenciais agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (subtipo $\alpha 7$) visando o tratamento da doença de Alzheimer.

2018 – 2018 Iniciação Científica. Título: Aplicações da Teoria de Grafos à Química.

2017 – 2017 Iniciação Científica. Título: Síntese e atividade biológica de derivados ciclopenta[β]indólicos.

Extensão

2015 – 2015 Química na Escola

2015 – 2015 A virtualidade da Química

Ensino

2018 – 2019 Residência Pedagógica

2016 – 2016 O desenvolvimento acadêmico e profissional relacionado à docência em Química através da participação ativa nas disciplinas de Química dos cursos Técnicos Integrados ao Ensino Médio e de Química Geral dos cursos superiores do IFSP - Matão

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

VELLOSA, A. B. S.; LIMA-FILHO, V. B.; SOARES, B. A.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Atividade de substâncias oriundas de produtos naturais e de origem sintética no contexto da Doença de Alzheimer: Alguns exemplos importantes dos últimos 20 anos. *Química Nova* (aceito para a publicação em 2022).

Livros e capítulos

SOUZA, R. A. de; VELLOSA, A. B. S. Revisão de conteúdos mediada por jogo de tabuleiro: aspectos atitudinais e aceitação de estudantes de Química do Ensino Médio. In: FRANCHI, S. J. S.; FRANCHI, G. O. O. M. O Ensino de Química na contemporaneidade: desafios e inovações, Pimenta Cultural: São Paulo (aceito para a publicação em 2022).

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

2017 SOUZA, R. A. de; VELLOSA, A. B. S. Revisão de conteúdos de Química envolvendo a aplicação de um jogo de tabuleiro: diagnóstico sobre a aceitação dos alunos. In: IX Encontro Paulista de Pesquisa em Ensino de Química – EPPEQ; Sertãozinho. Anais do IX EPPEQ - IFSP campus Sertãozinho.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

2018 VELLOSA, A. B. S.; MORAIS, A. L. Ensino de Química para deficientes visuais: proposta de construção de materiais didáticos de baixo custo. In: IV Congresso de Educação Profissional e Tecnológica, Araraquara. IV CONEPT.

2018 VELLOSA, A. B. S.; ROCHA, L. D. S. Aplicações da Teoria de Grafos com Ênfase na Química. In: 9º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica; Boituva. 9º CONICT.

2017 VELLOSA, A. B. S.; FERNANDES, D. C.; COELHO, F. A. S. Síntese e Atividade Biológica de Derivados Ciclopenta[β]indólicos. In: 8º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica; Cubatão. 8º CONICT.

Resumos publicados em anais de congressos

2019 SOUZA, R. A. de; VELLOSA, A. B. S. Proposição lúdica como atividade avaliativa do tema funções orgânicas. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: eixos mobilizadores em Química; Joinville. 42ª RASBQ.

2019 VELLOSA, A. B. S.; SILVA, E. C. S.; TOLEDO, J. B.; SOUZA, R. A. de. Um jogo para revisão de conteúdo de Química Orgânica no contexto do programa de Residência Pedagógica: desenvolvimento e aplicação. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: eixos mobilizadores em Química; Joinville. 42ª RASBQ.

2017 VELLOSA, A. B. S.; SILVA, S. A. S.; EBURNEO, M. F. S.; SANTOS, L. A.; ARAUJO, Y.; PEGLER, G. F.; MARUYAMA, J. A. A visão de bolsistas de um projeto de extensão: importâncias das TICs para a formação inicial de futuros professores. In: IX Encontro Paulista de Pesquisa em Ensino de Química; Sertãozinho. IX EPPEQ.

2015 VELLOSA, A. B. S.; SANTOS, L. A.; EBURNEO, M. F. S.; SILVA, S. A. S.; PEGLER, G. F.; ARAUJO, Y.; MARUYAMA, J. A. Filmagens de experimentos

no Ensino de Química. In: II Congresso de Extensão e a Mostra de Arte e Cultura do IFSP; Catanduva. II CEMAC.

Apresentações de Palestra

2016 VELLOSA, A. B. S.; SANTOS, L. A.; SILVA, S. A. S. ; EBURNEO, M. F. S.; FARIA, T. H. H. A química da cura.

PRODUÇÕES TÉCNICAS

2015 MARUYAMA, J. A.; VELLOSA, A. B. S.; SILVA, S. A. S.; EBURNEO, M. F. S.; SANTOS, L. A. Virtualidade da Química; Tema: Química experimental. (Rede social).

2017 VELLOSA, A. B. S.; MORAIS, A. L.. Ensino de química para deficientes visuais: Construção de materiais didáticos de baixo custo. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Materiais didáticos para deficientes visuais).

2017 SOUZA, R. A.; VELLOSA, A. B. S. Revisão de conteúdos de Química envolvendo a aplicação de um jogo de tabuleiro. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Jogos didáticos).

EVENTOS

Participação em eventos

2021 X Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos (XEMMSB), Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil, 24 a 28 de maio.

2019 2ª Escola de Modelagem Molecular da Unesp (2ªEMMUnesp), IQ - Araraquara/SP, 7 a 11 de janeiro.

2019 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (42ª RASBQ), Joinville/SC, 27 a 30 de maio.

2018 9º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia (9º CONICT), IFSP – Boituva/SP, 11 a 13 de dezembro.

2018 I Semana da Química do Campus Matão, IFSP – Matão/SP, 18 a 20 de junho.

2018 IV Congresso de Educação Profissional e Tecnológica do IFSP (IV CONEPT) IFSP – Araraquara/SP, 18 a 20 de setembro.

2018 Semana da Diversidade, IFSP – Matão/SP, 15 a 18 de abril.

2017 8º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia (8º CONICT), IFSP – Cubatão/SP, 6 a 9 de novembro.

2017 IX Encontro Paulista de Pesquisa em Ensino de Química (IX EPPEQ), IFSP – Sertãozinho/SP, 18 a 20 de outubro.

2017 Semana da Diversidade.

2016 7º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia (7º CONICT), IFSP – Matão/SP, 30 de novembro a 2 de dezembro.

2016 Dia do profissional da Área de Química, Escola Estadual Jardim Buscardi – Matão/SP, 17 de junho.

2016 Semana da Educação das Relações étnico-raciais, IFSP – Matão/SP, 1 a 25 de novembro.

2015 Casa Aberta, IFSP – Matão/SP, 14 a 17 de setembro.

2015 I Congresso de Educação Profissional e Tecnológica do IFSP (I CONEPT), IFSP – Sertãozinho/SP, 14 a 18 de setembro.

2015 II Congresso de Extensão e Mostra de Arte e Cultura do IFSP (II CEMAC), IFSP – Avaré/SP, 3 a 5 de novembro.

Organização de Eventos

2021 Pit Stop Brasil Mais, Sebrae Araraquara, 28 a 29 de setembro.

2016 Semana da Educação das Relações étnico-raciais, IFSP *campus* Matão, 1 a 25 de novembro.

2015 Casa Aberta, IFSP *campus* Matão, 14 a 17 e setembro.

2015 Semana do Meio Ambiente Melhor, IFSP *campus* Matão, 8 a 11 de junho.

AGRADECIMENTOS

Apesar da breve passagem, inicio meus agradecimentos ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara de forma geral, incluindo todos os servidores públicos que tive contato e que contribuíram de alguma forma para minha estadia e pesquisa de Mestrado na Universidade.

Agradeço também ao meu orientador Professor Doutor Nailton Monteiro do Nascimento Júnior por me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa e por toda a colaboração durante a realização de meu projeto. Estendo esses agradecimentos aos colegas de grupo Victor Batista, Leonardo Simões, Cinthia Kramer, Marcelle Vieira e Thaiz Ribeiro pela amizade, risadas e brincadeiras, conselhos e discussões científicas compartilhadas.

Durante o período inicial de meu Mestrado estagiei no Laboratório do Professor Doutor Antonio Burtoloso no Instituto de Química da USP de São Carlos, e afirmo que esse momento foi essencial para o desenvolvimento de meu projeto. Lá, aprendi muito do que sei hoje, e do que precisava para realizar a etapa experimental de minha pesquisa. Então, além do Prof. Dr. Antonio Burtoloso, deixo meu imenso agradecimento ao João Pedro Lima, técnico do laboratório que compartilhou comigo todo seu conhecimento em síntese orgânica e técnicas de caracterização de substâncias, durante minha estadia no laboratório e após meu retorno a UNESP, mantendo contato de forma virtual.

Aos meus pais Ana Paula Silva Velloso e Sérgio Ricardo de Freitas Velloso, agradeço por todo o investimento em minha educação, que me proporcionou concluir uma graduação e agora uma pós-graduação, algo que, infelizmente, poucos brasileiros alcançam atualmente com a situação precária e a falta de investimento na educação do país. Estendo esse agradecimento ao apoio psicológico através de muitas conversas, compartilhamento de experiências e amor para comigo em toda minha vida e ainda mais nos momentos de dificuldades, que foram muitos nos últimos 3 anos. Além deles, agradeço minhas avós, tios e primos, também por me darem amor e carinho, e estarem sempre dispostos a me apoiar no que precisar.

Sigo para outro agradecimento muito especial, a Rodrigo Alves de Souza, meu companheiro, que esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins desde o início do namoro. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e experiências comigo, por levantar o meu astral nos momentos difíceis que pensei em desistir da

vida acadêmica, pelos diversos conselhos, e por todo carinho e amor que me transmite diariamente.

Apesar de parecer estranho para alguns, agradeço também aos meus dois filhos pets, meus dois cachorros, Mogli e Marie Curie. Os animais são seres que não se importam com nossa aparência ou com nossa condição financeira, estão sempre dispostos a nos dar amor, carinho e alegrar nossos dias. Por isso, faço esse incomum agradecimento e estendo a todos os animais aos quais fui tutora, junto de minha família, ao longo da vida. Tenho certeza que essa relação com os animais contribuiu muito para a pessoa que sou hoje.

Agradeço a minha amiga Maria Gabriela Deberaldini que foi colega de turma na graduação, e entrou junto comigo no Mestrado. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e experiências, por ser companheira nas disciplinas, por me apoiar nos momentos em que outros viraram as costas e não me julgar. Posso dizer que é uma grande e verdadeira amiga que quero levar para toda a vida. Estendo também a outras duas grandes amigas, Gabriela Baptistini e Vanessa Garcia pelo companheirismo, acalento, experiências compartilhadas e afeto comigo.

Aos integrantes da banca de meu Exame de Qualificação, Professores Doutores Jean Leandro dos Santos e Antonio Burtoloso, novamente, pela contribuição com sugestões e críticas construtivas que certamente fizeram uma diferença positiva na construção de minha pesquisa e desta dissertação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2018/00187-7). Dessa forma deixo meus agradecimentos a ambas as instituições pelo apoio.

Nas favelas, no senado
Sujeira pra todo lado
Ninguém respeita a constituição
Mas todos acreditam no futuro da nação

Que país é esse?...

No Amazonas, no Araguaia-ia-ia
Na Baixada Fluminense
Mato Grosso, Minas Gerais
E no nordeste tudo em paz
Na morte eu descanso
Mas o sangue anda solto
Manchando os papéis
Documentos fiéis
Ao descanso do patrão

Que país é esse?...

Terceiro mundo se for
Piada no exterior
Mas o Brasil vai ficar rico
Vamos faturar um milhão
Quando vendermos todas as alma
Dos nossos índios num leilão

Que país é esse?

Que país é este - Legião Urbana
(composição: Renato Manfredini Junior)

Idolatrando fascista, apoiando a tortura
E o povo manipulado quer te pôr no poder
Eu sou a guerra civil, não temo sua
ditadura
E se alguém tem que morrer, então que
morra você

Cês falam em nome de Deus, mas são o
diabo
E o seu conceito de família anda atrasado
Sou Marielle e Mestre Moa, eu vim da
lama lapidado
Pique diamante de Serra Leoa [...]

[...] Vai acabar com a regalia?
Mano, que que você tá falando?
Sua marra é de ditador, tá mais pra
mamador
Mamando em nossa teta há mais de 28
anos [...]

[...] A sua ignorância contamina
Essa doença resulta em carnificina

Fascismo é um vírus que se dissemina
Informação é a cura e o rap é a vacina!
[...]

[...] E ele disse o que você pensa e não
diz, né?
Agora é minha vez de falar o que penso
Tá preocupado com futuro do país, né?
Vomita raiva baseado no bom senso

[...] Eu fico puto, porque pra mim cê
parece cego
E essa colônia fede mais que
decomposição
Luta de classe manipula essas peça lego
1984, te apresento O Grande Irmão

E a gente segue na desordem e
retrocesso, é fato
A história grita há muito tempo, cê não
quer ouvir
Cês seguem apoiando esse capitão do
mato
Pela cultura é vida ou morte, me chame
Zumbi [...]

[...] Me vejo entre as multidões do fundo
poço
Faço parte da maioria, mas só me resta o
osso
Não põe nas nossas costas se você só dá
desgosto
Anota no seu bloco: nós somos seu
melhor gozo

Educação abandonada
Quer que a saúde pública seja privatizada
Vende argumento falho, mulher mal
remunerada
Homofóbico, racista, isso sim é fraquejada
[...]

[...] Primeira vez que eu vejo o alvo ir de
encontro à flecha
Fecha a porta e ora pra no chão não ser
seu filho
Se Jesus voltasse, cês matava ele de
novo
E chamava de comunista por pensar
demais no povo [...]

Primavera fascista - Setor Proibido
(composição: MC's Bocaum, Leoni, Adikto,
Axant, Mary Jane, Vk Mac e Dudu)

RESUMO

Os receptores nicotínicos de acetilcolina estão relacionados a doenças como esquizofrenia, dependência química (álcool e tabaco), epilepsia, doença de Alzheimer, ansiedade e doença de Parkinson. Dentre os receptores nicotínicos de acetilcolina presentes no sistema nervoso central, o subtipo $\alpha 7$ é um dos mais abundantes. Como exemplo relevante das doenças supracitadas, a DA tem cerca de um novo caso a cada três segundos no mundo, de acordo com dados da *Alzheimer's Disease International*. Os receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ apresentam efeitos neuroprotetores, o que ameniza a neurotoxicidade induzida pela proteína β -amiloide, dessa forma, a modulação por agonistas desse receptor é considerada uma abordagem promissora para o tratamento da doença de Alzheimer. Nesse contexto, visando a obtenção de compostos inéditos com atividade agonista em receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ para o tratamento da doença de Alzheimer, este trabalho foi iniciado com a tentativa de síntese de 8 fragmentos, de padrão estrutural pirrolidínico, selecionadas após estudos detalhados de ancoragem molecular, descritos em trabalho prévio do grupo de pesquisa (LaQMedSOMM). A etapa seguinte consistiu na ancoragem molecular de fragmentos intermediários das reações citadas acima e análise das interações resultantes. Os resultados obtidos da etapa computacional mostram que a subunidade do grupo protetor *t*-butiloxicarbonil realiza interações importantes com resíduos chaves de aminoácidos e que moléculas com substituintes fluorados ocuparam melhores colocações na classificação em ordem crescente de número de interações. Já as substâncias com substituinte nitro na posição *orto* foram às únicas que apresentaram interações não favoráveis, ocupando as últimas posições na classificação. Quatro fragmentos foram sintetizados, isolados e caracterizados por RMN ^1H . As tentativas de redução do grupo carbonila das amidas não lograram êxito, gerando sempre mistura de muitos subprodutos.

Palavras-chave: doença de Alzheimer; nAChRs $\alpha 7$; ancoragem molecular; síntese orgânica; derivados pirrolidínicos.

ABSTRACT

Nicotinic acetylcholine receptors are related to diseases such as schizophrenia, chemical dependency (alcohol and tobacco), epilepsy, Alzheimer's disease, anxiety and Parkinson's disease. Among the nicotinic acetylcholine receptors present in the Central Nervous System, the $\alpha 7$ subtype is one of the most abundant. As a relevant example of the aforementioned diseases, Alzheimer's disease has about one new case every three seconds in the world, according to data from Alzheimer's Disease International. Subtype $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors have neuroprotective effects, mitigating the neurotoxicity induced by the β -amyloid protein, thus modulation by agonists of this receptor is considered a promising approach for the treatment of Alzheimer's disease. In this context, aiming to obtain novel compounds with agonist activity at $\alpha 7$ subtype nicotinic acetylcholine receptors for the treatment of Alzheimer's disease, this work began with an attempt to synthesize 8 fragments, with a pyrrolidine structural pattern, selected after detailed studies of molecular modeling, described in a previous work by the research group (LaQMedSOMM). The next step consisted of molecular anchoring of intermediate fragments of the reactions mentioned above and analysis of the resulting interactions. The results obtained from the computational step show that the t-butyloxycarbonyl protecting group subunit performs important interactions with key amino acid residues and that molecules with fluorinated substituents occupied better placements in the classification in ascending order of number of interactions. Substances with a nitro substituent in the ortho position were the only ones that presented non favorable interactions, occupying the last positions in the classification. Four fragments were synthesized, isolated and characterized by ^1H NMR. Attempts to reduce the carbonyl group of amides were unsuccessful, always generating a mixture of many by-products.

Keywords: Alzheimer's disease; nAChRs $\alpha 7$; molecular anchoring; organic synthesis; pyrrolidine derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina (1).....	20
Figura 2 – Projeção do crescimento do número de pessoas com DA (em milhões) em países desenvolvidos, emergentes e subdesenvolvidos	21
Figura 3 – Top 10 causas de mortes em 2016. Fonte: adap	21
Figura 4 – Estimativa de projeção dos gastos globais previstos para tratamento de demências de 2015 a 2030	22
Figura 5 – Campo neuronal saudável, à esquerda, e campo neuronal com emaranhados fibrilares, causados pelo acúmulo da proteína β -amiloide, à direita ...	25
Figura 6 – Hiperfosforilação da proteína TAU	26
Figura 7 – Vista lateral do nAChR $\alpha 7$, gerada pelo programa <i>PyMol</i> com divisão por domínios extracelular (DEC), transmembranar (DTM) e intracelular (DIC)..	27
Figura 8 – Vista superior do nAChR $\alpha 7$, gerada pelo programa <i>PyMol</i> . Em vermelho estão representadas as moléculas de 2 , onde os sítios ortostéricos de ligação estão localizados.....	28
Figura 9 – Exemplos de compostos que atuam de forma agonista e antagonista nos nAChRs do subtipo $\alpha 7$ da literatura.....	29
Figura 10 – Apresentação esquemática da localização do sítio de ligação de 2 , dos sítios ortostéricos e alostéricos	31
Figura 11 – Estruturas químicas de medicamentos aprovados pela FDA para o tratamento da doença de Alzheimer.....	32
Figura 12 – Substâncias com atividade destacada frente aos nAChRs $\alpha 7$	33
Figura 13 – Substâncias com atividade e potência destacadas frente aos nAChRs $\alpha 7$	33
Figura 14 – Planejamento estrutural de 28 fragmentos moleculares com padrão estrutural pirrolidínico, planejados com ligantes dos nAChRs $\alpha 7$	34
Figura 15 – Compostos de padrão pirrolidínico, selecionados com base nos estudos <i>in silico</i> , como candidatos a ligantes de nAChRs $\alpha 7$	35
Figura 16 – Rota sintética planejada para a obtenção dos derivados de padrão estrutural pirrolidínicos	38
Figura 17 – Anilinas utilizadas na etapa de acoplamento.....	38
Figura 18 – 16 fragmentos intermediários da reação	45
Figura 19 – Mecanismo geral de reação de acoplamento com DCC	48

Figura 20 – Mecanismo geral de reação de redução de amida com LiAlH ₄ .	49
Figura 21 – Espectro de RMN de ¹ H do intermediário 24h (300 MHz, CDCl ₃)	51
Figura 22 – Espectro vibracional no IV do composto 24h	52
Figura 23 – Espectro de RMN de ¹ H do intermediário 24i (300 MHz, CDCl ₃)	53
Figura 24 – Espectro vibracional no IV do composto 24i (300 MHz, CDCl ₃)	54
Figura 25 – Espectro de RMN de ¹ H do intermediário 25h (300 MHz, DMSO-d ₆)	55
Figura 26 – Espectro vibracional no IV do composto 25h (300 MHz, CDCl ₃)	56
Figura 27 – Espectro de RMN de ¹ H do intermediário 25i (300 MHz, DMSO-d ₆)	57
Figura 28 – Gráfico de Ramachandran, referente à estrutura cristalográfica da 5AFH, co-cristalizada com 2 .	58
Figura 29 – Resíduos de aminoácidos do sítio ativo (Entre cadeias B e C), os quais são modulados por 2 . Em vermelho átomos de oxigênio, em azul átomos de nitrogênio e em preto átomos de carbono. (PDB ID:5AFH)	59
Figura 30 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 24h (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 24h (átomos de C em rosa) e 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	61
Figura 31 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 25h (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 25h (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	61
Figura 32 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 24e (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 24e (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	62
Figura 33 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 25e (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 25e (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	62
Figura 34 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 24k (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 24k (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	63
Figura 35 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 25k (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 25k (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	63
Figura 36 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 24b (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 24b (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	64

Figura 37 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 25b (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 25b (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	65
Figura 38 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 24i (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 24i (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	65
Figura 39 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 25i (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 25i (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	66
Figura 40 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 24f (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 24f (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	67
Figura 41 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 25f (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 25f (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	67
Figura 42 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 24l (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 24l (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	68
Figura 43 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 25l (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 25l (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	68
Figura 44 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 24m (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 24m (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	69
Figura 45 – A, pose melhor ranqueada para o ligante 25m (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante 25m (átomos de C em rosa) e a 2 co-cristalizada (átomos de C em amarelo).	69
Figura 46 – Ligações de hidrogênio (linha tracejada em preto) entre os ligantes A: 25i ; B: 25l ; C: 25m ; D: 25f (átomos de carbono em rosa) com o resíduo de aminoácido W53 (átomos de carbono em verde).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh: acetilcolina

AChBP: proteína ligante de acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase humana

ADI: *Alzheimer's Disease International*

APOE: apolipoproteína E

Boc: *N*-(*t*-butoxicarbonil)

CCD: cromatografia em camada delgada

DA: doença de Alzheimer

DCC: *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida

DCM: diclorometano

DMSO: dimetilsulfóxido deuterado

EC₅₀: concentração mínima de um composto necessária para produzir metade do efeito máximo, *in vivo*

FDA: *Food and Drug Administration*

HOBt: hidroxibenzotriazol

HTS: *high-throughput screening*

IC₅₀: concentração mínima de um composto necessária para reduzir o crescimento populacional de organismos em 50 por cento, *in vitro*.

IV: Infravermelho

K_i: constante de dissociação do complexo enzima-inibidor

nAChRs: receptores nicotínicos de acetilcolina

PDB: *Protein Data Bank*

R_f: fator de retenção

RMN: ressonância magnética nuclear

SBDD: *structure-based drug design*

SNC: sistema nervoso central

SPN: sistema nervoso periférico

SUS: sistema Único de Saúde

TFA: ácido trifluoroacético

THF: tetrahidrofurano

δ: deslocamento químico

Aminoácidos

W: Triptofano

Y: Tirosina

C: Cisteína

L: Leucina

K: Lisina

S: Serina

E: Glutamato

Átomos

C: carbono

N: nitrogênio

O: oxigênio

H: hidrogênio

F: flúor

Cl: cloro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	37
3	MATERIAIS E METODOLOGIA	38
3.1	Reagentes e Solventes	39
3.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	39
3.3	Síntese do intermediário 24h	40
3.4	Síntese do intermediário 24i	40
3.5	Síntese do intermediário 25h	41
3.6	Síntese do intermediário 25i	42
3.7	Síntese do produto final 21h	42
3.8	Síntese do produto final 21i	43
3.9	Ancoragem Molecular	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Reações de acoplamento	47
4.2	Reações de retirada do grupo protetor <i>Boc</i>	48
4.3	Reações de redução da amida	48
4.4	Caracterização	50
4.4.1	Caracterização do intermediário 24h	50
4.4.2	Caracterização do intermediário 24i	52
4.4.3	Caracterização do intermediário 25h	54
4.4.4	Caracterização do intermediário 25i	56
4.5	Análise dos resultados da etapa de estudos computacionais	58
5	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma das enfermidades neurodegenerativas mais comuns mundialmente, correspondendo de 60 a 80% dos casos. O primeiro relato dela ocorreu em 1907, pelo psiquiatra clínico e neuropatologista alemão Alois Alzheimer (STRASSNIG; GANGULI, 2005). Porém, apenas a partir da década de 1970, o interesse em investigar a doença cresceu significativamente (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003). Este transtorno neurodegenerativo progressivo se manifesta através da diminuição gradual da memória e do declínio severo das funções cognitivas, que estão aliados à degradação de neurônios colinérgicos do sistema nervoso central (SNC) e à redução significativa de neurotransmissores, em especial a acetilcolina (ACh) (1) mostrada na **Figura 1** (VIEGAS; *et al.* 2011).

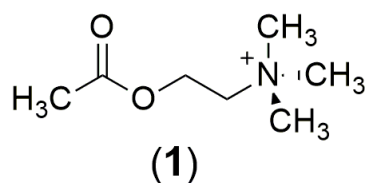


Figura 1 – Estrutura química do neurotransmissor ACh (1).

Fonte: elaborada pela autora a partir da literatura (VIEGAS *et al.*, 2011).

Em setembro de 2020, as vésperas do Dia Mundial do Alzheimer, a *Alzheimer's Disease International* (ADI) publicou o mais atual Relatório Mundial de Alzheimer. O documento relata que atualmente é diagnosticado um caso da doença a cada três segundos no mundo. A mesma fonte constatou cerca de 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo vivendo com DA em 2015. Esse número subiu para 50 milhões no ano de 2018 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER, 2018). Em dados mais atuais, as estimativas do último relatório mundial foi de 82 milhões no ano 2030 e 152 milhões em 2050, com cerca de 70% dos afetados residindo em países de baixa e média renda, como mostrado na **Figura 2** (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2020). Essa discrepância relacionada à economia dos países se dá devido à influência do acometimento pela doença e a qualidade de vida, fato esse que está diretamente relacionado a questões financeiras.

A projeção de aumento da população mundial entre os anos de 2015 e 2050 é de aproximadamente 33% segundo dados da *World Health Organization* (2019). Enquanto as projeções de crescimento de pessoas acometidas pela DA são de

aproximadamente 225%, um aumento não proporcional, que mostra a gravidade da doença. No Brasil, a tendência de casos a serem relatados ficou em torno de 55 mil por ano, no período de 2010–2020 (CESTARI, 2013). Além disso, a DA e outras demências se encontrava na sétima posição, dentre as doenças que mais matam no mundo, em 2019 (**Figura 3**) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

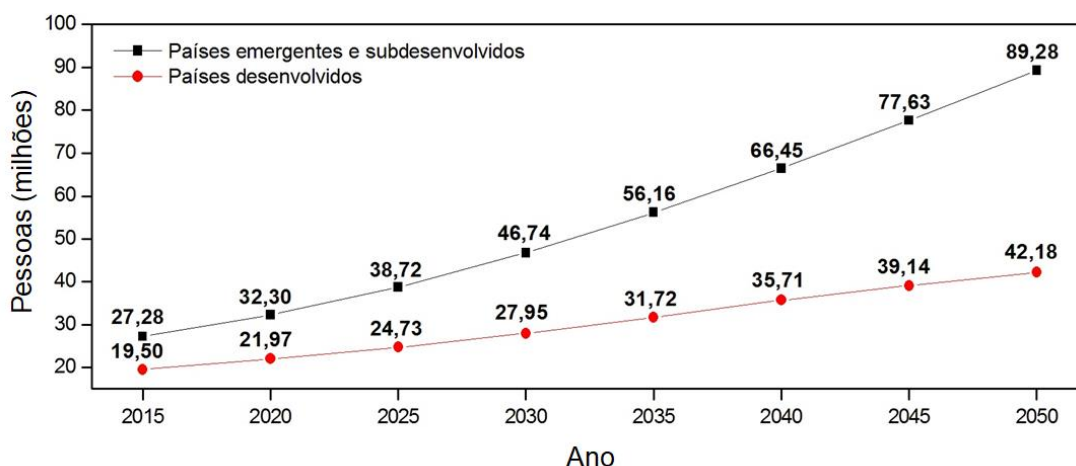


Figura 2 – Projeção do crescimento do número de pessoas com DA (em milhões) em países desenvolvidos, emergentes e subdesenvolvidos.

Fonte: elaborada pela autora, com dados extraídos de *Alzheimer's Disease International* (2020).

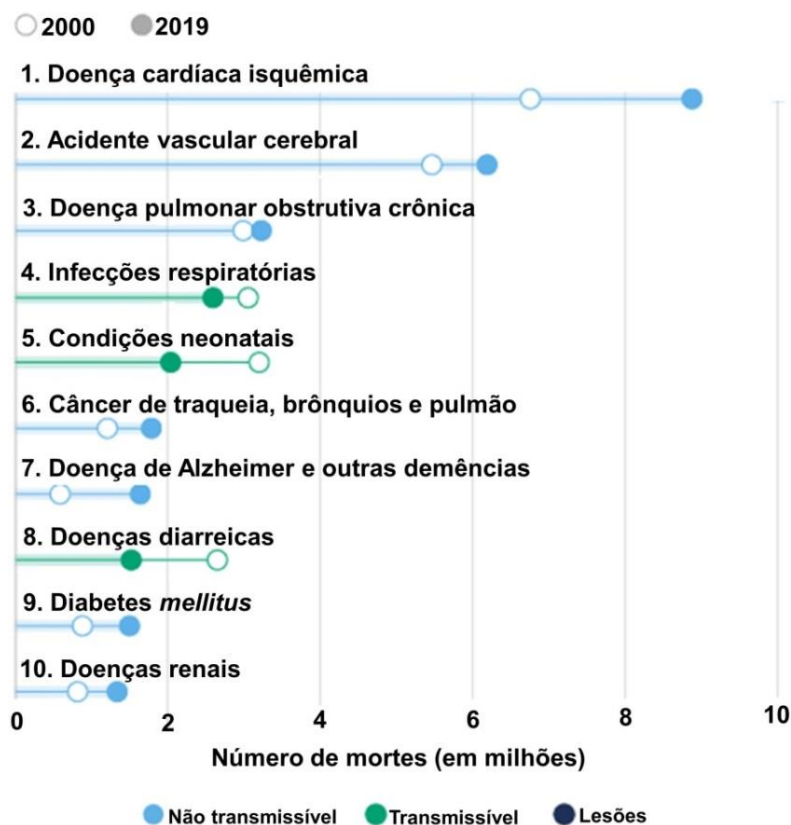


Figura 3 – As 10 principais causas de morte no mundo em 2000 e 2019.

Fonte: adaptada de *World Health Organization* (2020).

Sob o ponto de vista econômico, projetou-se que o custo anual com tratamentos para demências, incluindo Alzheimer, tanto por parte da população quanto dos órgãos governamentais de serviços de saúde, gerou impactos econômicos de aproximadamente US\$ 818 bilhões em 2015, US\$ 1,3 trilhão em 2019 e com estimativa de US\$2 trilhões até 2030 no mundo todo (**Figura 4**). Se as projeções forem corrigidas considerando os aumentos esperados nos custos de prestação de cuidados, os gastos globais aumentarão para quase US \$ 2,8 trilhões em 2030. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil, em 2018, foram gastos mais de 13,5 milhões de reais pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em serviços hospitalares a pacientes com demência, resultando em uma média de 71,9 dias de permanência nas internações (ZALLI; FARAH; ANTUNES, 2020).

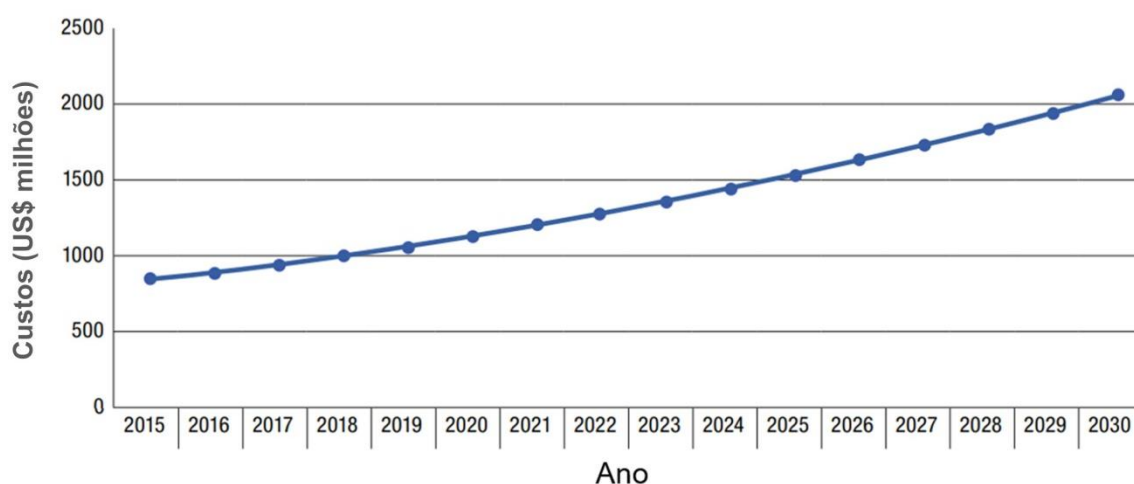


Figura 4 – Estimativa de projeção dos gastos globais previstos para tratamento de demências de 2015 a 2030.

Fonte: World Health Organization (2021).

Segundo o Relatório Mundial de Alzheimer (*Alzheimer's Disease International*, 2020) a porcentagem da população que pode manifestar esta desordem aumenta conforme a idade, acometendo cerca de 7% da população mundial entre 65 - 84 anos, podendo chegar esse número a 30% dos indivíduos com mais de 85 anos.

Além da idade, o sexo feminino ou masculino também influencia o acometimento da DA. Nesse sentido, uma pesquisa foi realizada de 2008 a 2013, com 7.637 pacientes, que passavam por cuidados de longa duração em lares de idosos na Província de Podlaskie na Polônia, a fim de comparar a idade e o sexo de pacientes diagnosticados com DA, como pode ser observado na **Tabela 1** (MOJSA, 2015).

Tabela 1 – Frequência do diagnóstico de DA em relação à idade e ao sexo.

Tabela 2 – Frequência do diagnóstico de DVE em relação à idade e ao sexo.					
			Faixa etária		
			< 65	> 65	Total
Sexo	Feminino	N	14	164	178
		%	7,9%	92,1%	100%
	Masculino	N	1	48	49
		%	2%	98%	100%
	Total	N	15	212	227
		%	6,6%	93,4%	100%

Fonte: elaborada pela autora, com dados extraídos de Mojsa (2015).

Entre todos os 7637 pacientes pesquisados, a doença de Alzheimer foi diagnosticada em 227 pessoas (2,972%). Dessas 227 pessoas, é possível observar 15 com menos de 65 anos que foram diagnosticados com a doença, dentre elas, 1 homem e 14 mulheres. Já a porcentagem de acometidos com mais de 65 anos foi de 93,4% das 227, incluindo 164 mulheres e 48 homens. Dessa forma, a pesquisa mostra a prevalência da DA no sexo feminino. Dessa forma, pode-se constatar uma forte prevalência da DA no sexo feminino (MOJSA, 2015).

A maior incidência em mulheres pode ser explicada por diversos motivos, como o efeito negativo da apolipoproteína E $\epsilon 4$ (APOE), que é a principal determinante genética da DA, porém em uma faixa específica de idade (55 a 70 anos) (DUBAL; ROGINE, 2017). A APOE é transportadora de colesterol, podendo interagir com β -amiloide ($A\beta$), e contribuir para a agregação, o acúmulo e o depósito dessa proteína no cérebro, resultando na disfunção sináptica e a neurodegeneração, e nesse caso, as mulheres são mais vulneráveis a essa ação segundo estudos. (LIU; *et al.* 2013; QIU; *et al.* 2014; WOLF; *et al.* 2013). Outra hipótese é atribuída aos hormônios sexuais, pois diferente dos homens, a produção de hormônios cai de forma mais rápida após a menopausa que é quando a incidência da doença aumenta (HALL; *et al.* 2015).

Apesar dos dados se mostrarem crescentes, o relatório mundial da DA (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2020) destacou um estudo feito com aproximadamente 70 mil pessoas de 100 países diferentes, constatando a desinformação da população em relação à demência de forma geral. Cerca de dois terços dos participantes pensam que a demência é normal e que faz parte da velhice. Esse dado alarmante demonstra uma falta de orientação sobre o tema, que na maioria dos casos pode prejudicar o diagnóstico precoce e o tratamento adequado.

Adicionalmente essa doença é multifatorial estando relacionada a diversos fatores de risco como, por exemplo: tabagismo, envelhecimento, sedentarismo, maus hábitos alimentares, influência neurotóxica do alumínio proveniente da ingestão de água e da exposição e doenças crônicas (*Diabete mellitus*, hipertensão, isquemia cerebral, hipercolesterolemia). Além disso, há também a origem genética que influencia na maioria dos casos. Essa situação inclui anormalidades em genes relacionados à β -amiloide, que é uma proteína composta por 39–42 aminoácidos e encontra-se em depósitos extracelulares por todo o SNC. Essa proteína se forma através da clivagem de sua precursora por ação das proteases β - e γ -secretases (CANNON, 2007).

A pandemia da Covid-19 também despertou o interesse em avaliar a possível relação entre o SARS-CoV-2 e a DA. Um desses estudos foi realizado por pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP), em conjunto com o Instituto Butantan e a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Foram investigados 12.863 pacientes com mais de 65 anos (1.814 com mais de 80 anos) positivados ou não para SARS-CoV-2. Essas pessoas foram cadastradas entre março e agosto de 2020 no *UK Biobank* (TAHIRA; ALMEIDA; FERREIRA, 2021).

Entre todos os pacientes, 1.167 foram positivados com o vírus, e para analisar se a idade pode ser considerada um fator de risco, os indivíduos avaliados foram divididos em três faixas etárias: de 66 a 74, 75 a 79 e 80 anos ou mais. Os resultados indicam que todas as causas de demência, independentemente da idade, são fatores de risco que aumentam a gravidade da COVID-19 e de morte pelo vírus. A doença de Alzheimer, em específico, não aumentou o risco de hospitalização quando comparada com as comorbidades crônicas. Porém, os pacientes com a doença neurodegenerativa apresentaram risco três vezes maior de desenvolver quadro grave ou morrer quando eram internados, se comparado com pacientes que não tinham a DA. Esse risco cresceu seis vezes para pacientes acima de 80 anos (TAHIRA; ALMEIDA; FERREIRA, 2021).

Fisiologicamente, a DA é um distúrbio cerebral neurodegenerativo progressivo que causa interrupção significativa, tanto na estrutura quanto nas funções cerebrais. Em nível celular, a doença é caracterizada por perda progressiva de neurônios responsáveis por mediar as funções cognitivas, causando disfunção sináptica e interrompendo as comunicações neuronais, o que afeta a memória, o comportamento, a personalidade e a capacidade funcional do indivíduo (KOROLEV,

2014). Sabe-se também que o desenvolvimento da doença ocorre em três estágios sendo eles: leve, moderado e grave. Os sintomas iniciam geralmente com o esquecimento, seguindo para a perda irreversível de memória e por fim há o comprometimento das habilidades cotidianas.

Um ponto em comum detectado em portadores da DA é a presença dos emaranhados fibrilares (filamentos helicoidais) (**Figura 5**), que se depositam no tecido neuronal, resultando a formação de placas senis. Isso se dá devido ao acúmulo da proteína β -amiloide, cujos seus fragmentos formam esses emaranhados prejudicando a comunicação interneuronal (MAZUROV; SPEAKE; YOHANNES, 2011). Além disso, sabe-se que nessas pessoas, a proteína Tau, que tem a função de estabilizar os microtúbulos dos axônios, passa por um processo anormal de hiperfosforilação, que modifica suas funções (**Figura 6**) (AYLLÓN; *et al.* 2011).

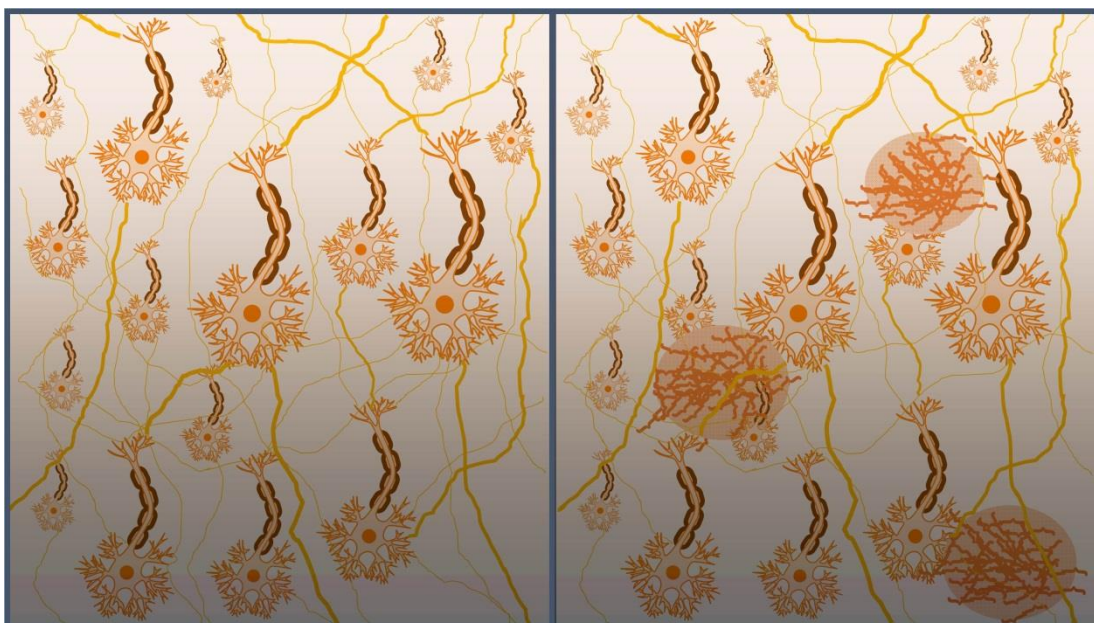


Figura 5 – Campo neuronal saudável, à esquerda, e campo neuronal com emaranhados fibrilares, causados pelo acúmulo da proteína β -amiloide, à direita.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

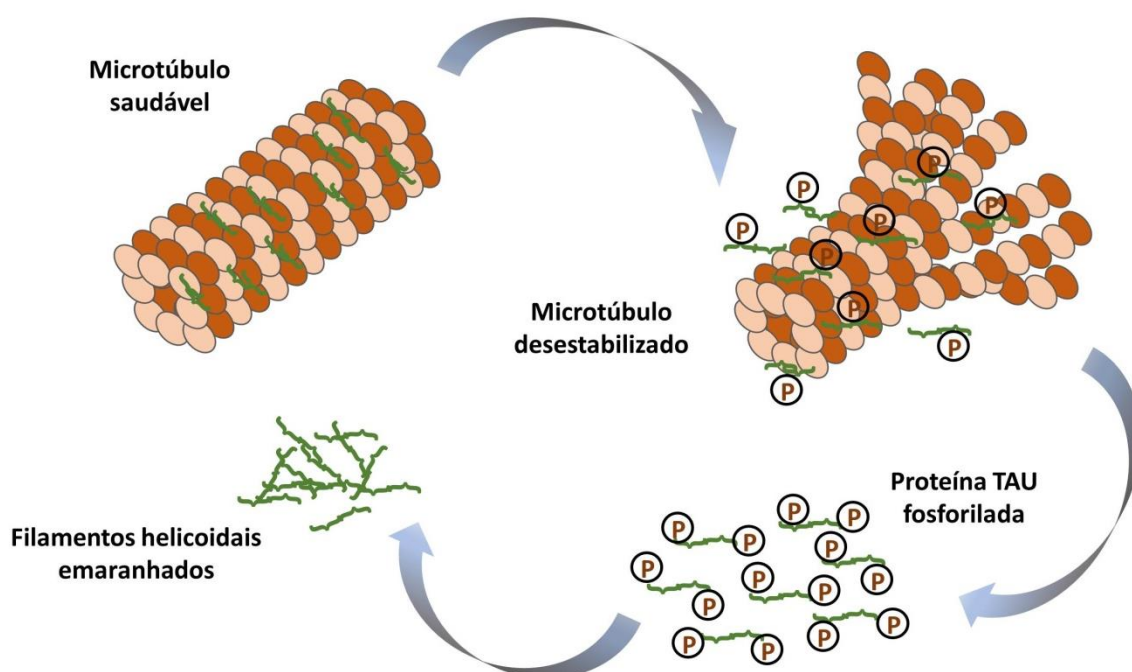


Figura 6 – Hiperfosforilação da proteína TAU.

Fonte: elaborada pela autora, adaptada de PAULA; *et al.* (2009).

Embora o papel dessas placas e emaranhados não seja completamente conhecido, sabe-se que são encontrados em maior quantidade nas áreas do cérebro mais afetadas pela DA, ou seja, hipocampo, córtex parieto occipital, córtex temporal e córtex frontal (PITHADIA, 2008). Dessa forma, tem-se a perda de neurônios e interconexões neuronais no terceiro e no último estágio da doença. Um dos neurotransmissores acometidos nesse processo é a ACh (**1**), que sofre com a redução no número de seus sítios de ligação, ou seja, a diminuição dos níveis de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (SCRIMPF; *et al.* 2012).

Os nAChRs são majoritariamente encontrados em células neuronais, no sistema nervoso periférico (SNP) e no SNC, e são compostos por várias subunidades do tipo α e β , que são influentes na determinação das propriedades farmacológicas e cinéticas (LOMBARDO; MASKOS, 2015). Os nAChRs possuem três domínios como mostrado na (**Figura 7**). Esses domínios são: extracelular *N*-terminal onde se localizam os sítios ortostéricos; transmembranar e intracelular (SPURNY; *et al.* 2015). O neurotransmissor ACh (**1**) ativa os receptores se ligando ao domínio extracelular, resultando na abertura de um canal localizado no domínio transmembranar. Isso possibilita a passagem de um fluxo de cátions Ca^{2+} através do

poro do canal, com despolarização da membrana celular e inicia, assim, o potencial de ação (OZ; *et al.* 2013).

Os nAChRs do subtipo $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ são prevalentes no cérebro em comparação com os demais e tem relações com a DA (SURESH; HANG, 2016). Os receptores do subtipo $\alpha 4\beta 2$ possuem duas subunidades $\alpha 4$ e três $\beta 2$ e atuam na função da memória, mediando a liberação de algumas substâncias como: **1**, glutamato, aspartato, ácido gama-aminobutírico e dopamina. Isso torna possível a permeabilidade desses receptores por íons Ca^{2+} melhorando o desempenho na atividade pré-sináptica. Esses receptores também são relevantes na abertura e na ativação de canais do mesmo tipo de íon citado anteriormente, que dependem de voltagem por despolarização da membrana pré-sináptica. Como resultado, essa ação torna possível a liberação de neurotransmissores (MORALES-PEREZ; NOVIELLO; HIBBS, 2016). Já os receptores do subtipo $\alpha 7$, que encontram-se mais concentrados no hipotálamo e no hipocampo, são compostos por cinco subunidades $\alpha 7$ como mostra a **Figura 8** (SURESH; HANG, 2016).

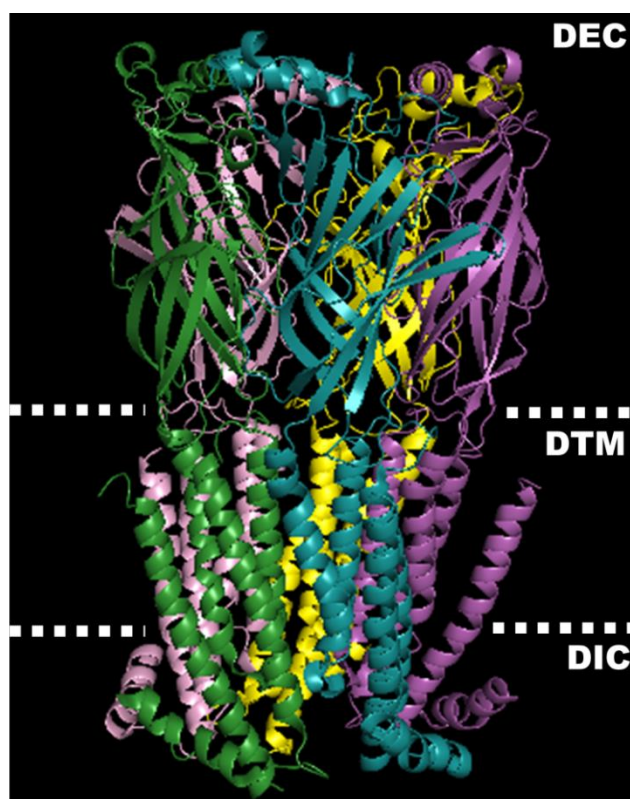


Figura 7 – Vista lateral do nAChR $\alpha 7$, gerada pelo programa PyMol com divisão por domínios extracelular (DEC), transmembranar (DTM) e intracelular (DIC).
Fonte: elaborada pela autora com arquivo retirado do *Protein Data Bank*, 2021.

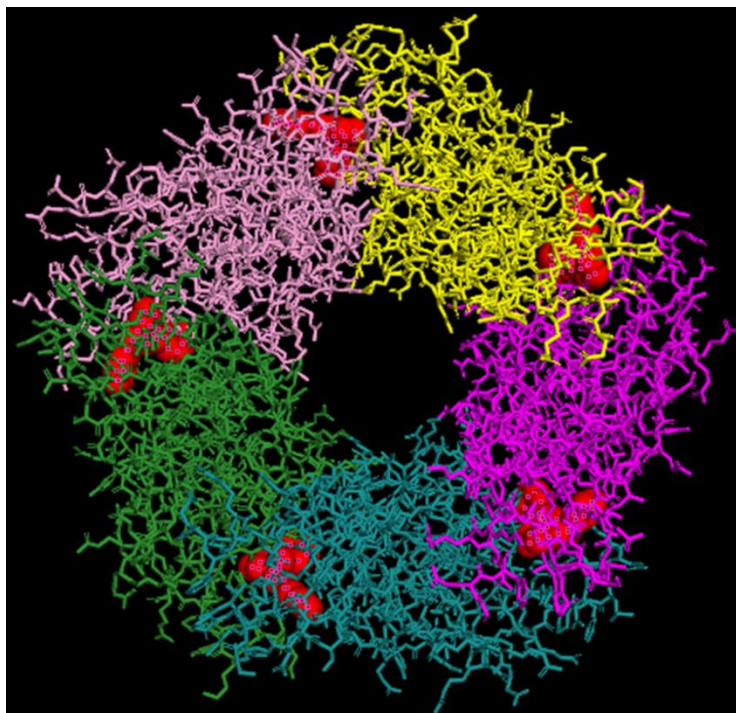


Figura 8 – Vista superior do nAChR $\alpha 7$, gerada pelo programa *PyMol*. Em vermelho estão representadas as moléculas de **2** (**Figura 9**), onde os sítios ortostéricos de ligação estão localizados.

Fonte: elaborada pela autora com arquivo retirado do *Protein Data Bank*, 2021.

Estudos realizados com roedores (em 2015), analisando agonistas parciais e totais (estruturas que ativam parcial ou totalmente o receptor) dos nAChRs $\alpha 7$, mostram uma eficiência no tratamento de distúrbios neurológicos, como o mal de Parkinson e a esquizofrenia. Foi observada também uma melhora ao controlar desordens motoras causadas por medicamentos como, por exemplo, as discinesias induzidas por levodopa, que ocorrem no tratamento da doença supracitada (QUIK; *et al.* 2015; WALLACE; BERTRAND, 2015).

As subunidades que compõem os nAChRs neuronais do tipo $\alpha 7$ conferem a eles uma quantidade maior de sítios ortostéricos (sítio de ligação que é reconhecido pelo agonista endógeno, a ACh) comparado aos demais receptores heteroméricos (com subunidades de diferentes tipos), visto que estes sítios são localizados na interface entre duas subunidades alfas. Segundo estudos recentes, realizados com roedores, comprovou-se que os nAChRs $\alpha 7$ produzem efeitos neuroprotetores amenizando a neurotoxicidade induzida pela proteína β -amiloide no córtex e no hipocampo (ETEGHAD; *et al.* 2015). Esses receptores também apresentam uma boa permeabilidade a íons Ca^{2+} , tornando-os candidatos a moduladores da plasticidade neuronal. Além disso, quando ativados agem na

diminuição da fosforilação da proteína Tau, inibindo a formação de emaranhados fibrilares, que são os principais marcadores intracelulares para a DA(ATZORI; OSCOS; ARIAS, 2016).

Retomando a questão da atual pandemia, um grupo de pesquisadores estão analisando as interações SARS-CoV-2 com os nAChRs. Após estudos computacionais, observaram que a glicoproteína SARS-CoV-2 Spike tem uma sequência "semelhante a uma toxina" em seu domínio de ligação ao receptor (DLR). Dessa forma, poderia se ligar ao domínio de ligação à toxina da subunidade alfa dos nAChRs. Esta ligação, envolvendo principalmente nAChRs $\alpha 7$, poderia desregular o SNC, tendo como consequência o rompimento da via colinérgica anti-inflamatória que por sua vez levaria a uma “tempestade de citocinas” e causaria incapacidade de retornar à homeostase para a resposta imune (LAGOUMINTZIS; *et al.* 2021).

Dessa forma, tendo os nAChRs $\alpha 7$ como um alvo de extrema importância para algumas doenças, principalmente a DA, a **Figura 9** mostra alguns compostos bioativos da literatura que atuam nesses receptores e no parágrafo a seguir seus potenciais de ação como agonistas e antagonistas.

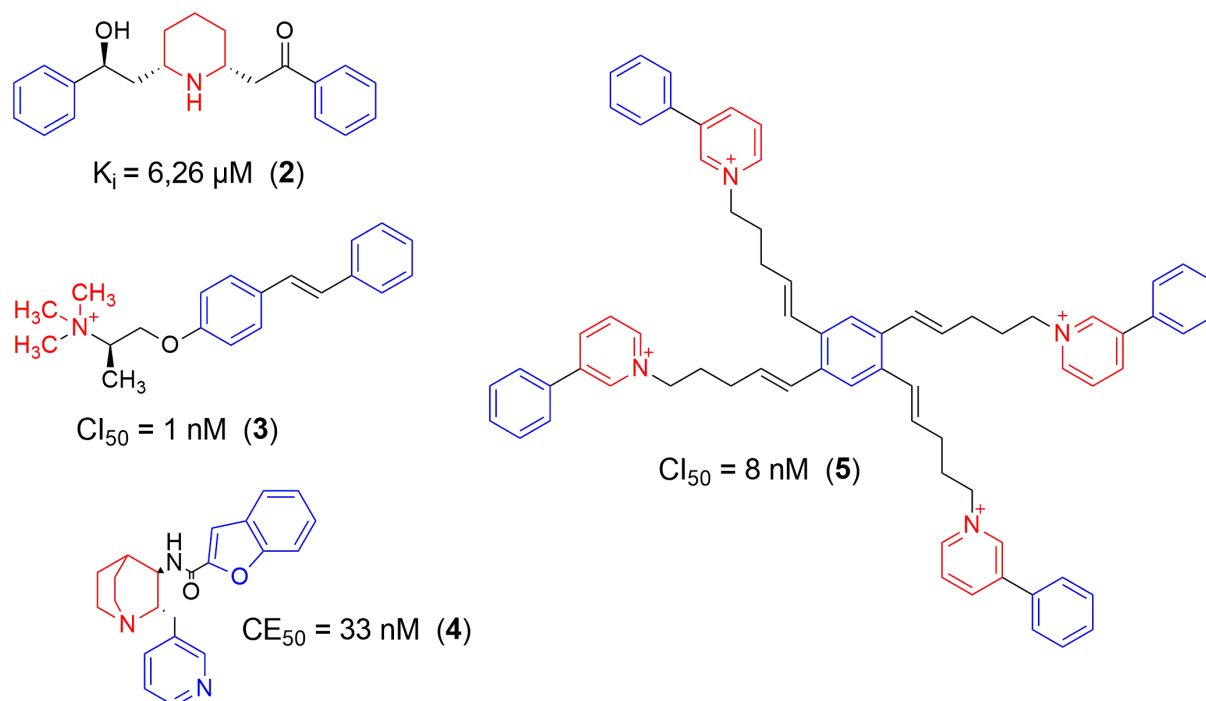


Figura 9 – Exemplos de compostos que atuam de forma agonista (2 e 4) e antagonista (3 e 5) nos nAChRs do subtipo $\alpha 7$ da literatura.

Fonte: elaborada pela autora a partir da literatura (GOTTI; *et al.* 1998; HOJAHMAT; *et al.* 2010; MAZUROV; SPEAKE; YOHANNES, 2011; ZHENG; *et al.* 2011).

A lobelina (**2**) é um alcaloide encontrado na planta *Lobelia inflata* e já foi estudada como candidata para o tratamento da dependência de nicotina. Porém, faltaram evidências de eficiência para tal função (STEAD; HUGHES, 2012). Nos nAChRs $\alpha 7$ essa molécula apresenta alta afinidade agindo como agonista. Ela também interage com transportadores de monoamina incluindo transportadores de dopamina e transportadores de serotonina de maneira não-específica (HOJAHMAT; *et al.* 2010). Além disso, é o ligante que foi co-cristalizado com a proteína utilizada neste trabalho.

O estilbeno substituído (**3**) também se mostrou promissor como antagonista competitivo e seletivo dos nAChRs $\alpha 7$ em cérebros de galinhas ($IC_{50} = 119$ nM) (GOTTI; *et al.* 1998). Há também a bradaniclina (**4**), agonista parcial que apresentou boa afinidade pelos nAChRs $\alpha 7$ no estudo referenciado (MAZUROV; SPEAKE; YOHANNES, 2011). E o composto **5**, desenvolvido por ZHENG e colaboradores (2011), apresentou boa inibição do receptor alvo (nAChRs do subtipo $\alpha 9\alpha 10$, $IC_{50} = 0,56$ nM) e também do subtipo $\alpha 7$.

Dessa forma, nAChRs do subtipo $\alpha 7$ foram escolhidos como alvos terapêuticos deste projeto, devido à sua inegável importância junto à regulação dos processos cognitivos, que são afetados pela doença de Alzheimer. E, para a realização da etapa computacional, foi utilizada a estrutura da proteína ligante de ACh 5AFH humana, obtida por difratometria de raios X, no estado não ligado, em complexo com **2**. Esta estrutura revelou a existência de três sítios alostéricos (sítio de ligação que não tem sobreposição, é espacialmente distinta, mas conformacionalmente ligado ao sítio ortostérico). O primeiro é exposto à superfície localizada próxima à hélice α N-terminal do domínio extracelular (sítio superior). A interação do ligante neste local causa uma mudança conformacional da α -hélice. Um segundo sítio está localizado no vestíbulo do receptor (sítio do vestíbulo), em uma bolsa intrassubunidade preexistente, oposta ao local de ligação do agonista. Por fim o terceiro sítio alostérico se encontra em uma bolsa abaixo do local de ligação do agonista (sub bolsão do agonista). Há também 5 sítios de ligação ortostéricos entre cada duas subunidades $\alpha 7$ (**Figura 10**) (SPURNY; *et al.* 2015).

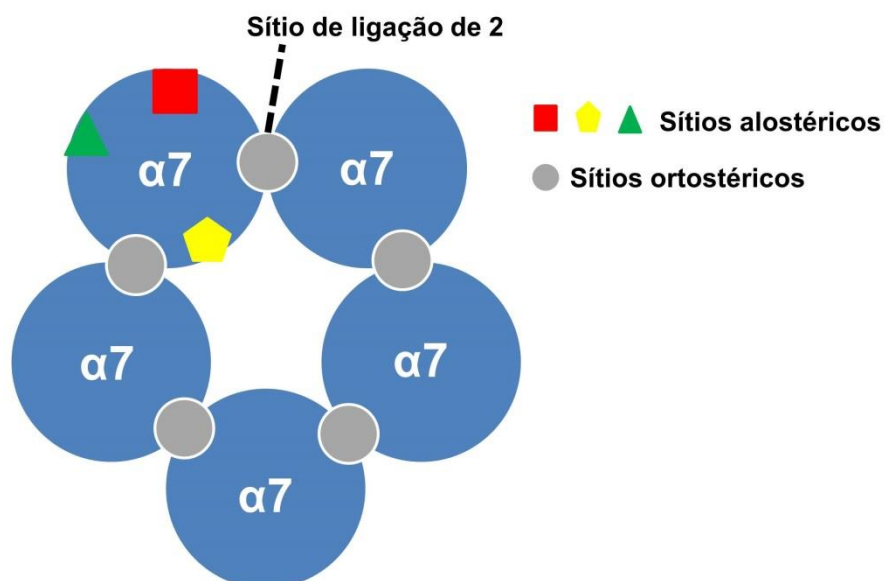


Figura 10 – Apresentação esquemática da localização do sítio de ligação de **2**, dos sítios ortostéricos e alostéricos.

Fonte: adaptada de SPURNY; *et al.* (2015).

Apesar de diversos estudos na área, atualmente ainda não há tratamentos disponíveis que interrompam o dano cerebral causado pela DA. Recomenda-se, portanto, tratamentos não-farmacológicos, como intervenções multifatoriais que retardem ou evitem o surgimento da DA, incluindo atividades físicas, terapia ocupacional, musicoterapia e fisioterapia, além dos vários medicamentos prescritos para amenizar temporariamente os sintomas de pessoas diagnosticadas (FANG; *et al.* 2017). Assim, no contexto das abordagens farmacológicas paliativas, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou alguns medicamentos para tratamento dos sintomas da doença, sendo os principais: donepezila (**6**) (Aricept®, 1996), galantamina (**7**) (Razadyne®, 2001), rivastigmina (**8**) (Exelon®, 2000) e memantina (**9**) (Namenda®, 2003), (**Figura 11**) (CUMMINGS; *et al.* 2015).

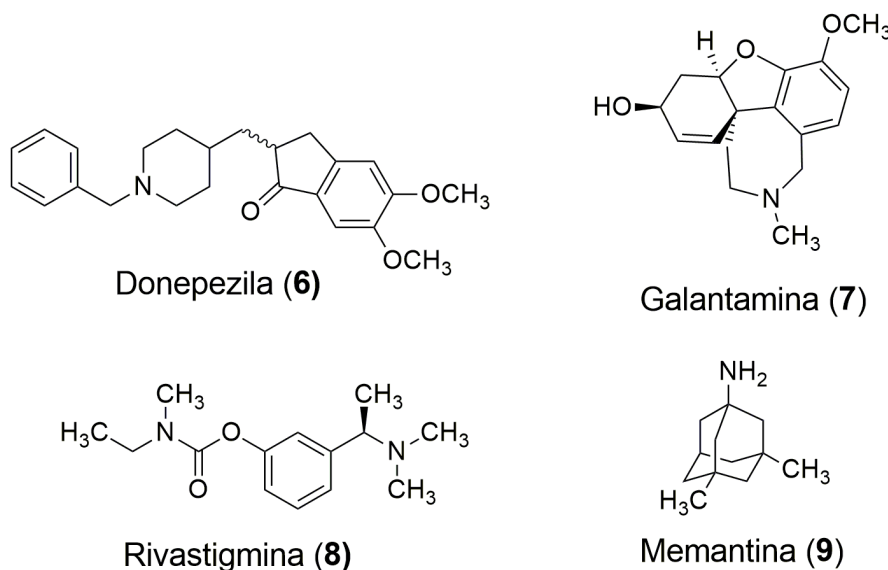


Figura 11 – Estruturas químicas de medicamentos aprovados pela FDA para o tratamento da doença de Alzheimer.

Fonte: elaborada pela autora a partir da literatura (CUMMINGS; et al. 2015).

Os fármacos **6**, **7** e **8** são inibidores da acetilcolinesterase (AChE) (responsáveis pela prevenção da degradação de **1**) e são prescritos para estágios de leve a moderado da doença, ajudado a controlar os sintomas. Já **9** é indicado para tratar casos moderados a graves, atuando como regulador de glutamato (neurotransmissor que ajuda a manter habilidades comuns). Existe também o Namzaric®, em que combina a memantina (**9**) e donepezila (**6**), e foi aprovado para o tratamento de casos moderados a graves (MOLINO; et al. 2013).

Considerando a alta incidência de pessoas afetadas pela DA, estudos surgiram com intuito de buscar novos agonistas dos nAChRs $\alpha 7$, e alguns se mostram promissores. Mazurov e colaboradores (2011) trabalharam com o derivado heterocíclico (RG3487), (**10**) (**Figura 12**) que age como agonista parcial dos nAChRs $\alpha 7$ (63–69% de ACh), na busca de possíveis alternativas para o tratamento de distúrbios neurológicos, como a esquizofrenia e a DA. Analisando o perfil de **10**, estudos comprovaram alta afinidade pelos nAChRs $\alpha 7$ em roedores ($K_i = 10$ nM) e em humanos ($K_i = 6$ nM). A ação do composto exibiu mínima afinidade com outros receptores nicotínicos ($\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta$ e $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$) e mostrou seletividade contra outros neurotransmissores e locais de receptores hormonais no perfil CEREP. Em 2007, a corporação *Memory Pharmaceuticals* relatou resultados positivos de um ensaio clínico de fase IIa de **10** para o tratamento da doença de Alzheimer, mas a substância não reverteu o comprometimento cognitivo em esquizofrênicos

(UMBRICHT; *et al.* 2009). Além do composto **10**, em um trabalho mais recente (HERNANDEZ; *et al.* 2019) tem-se a síntese, caracterização farmacológica e relação estrutura–atividade de agonistas seletivos não canônicos para nAChRs $\alpha 7$ com centro pirimidínico e substituição nas posições 2, 4 e 6 (**11–15** **Figura 12**).

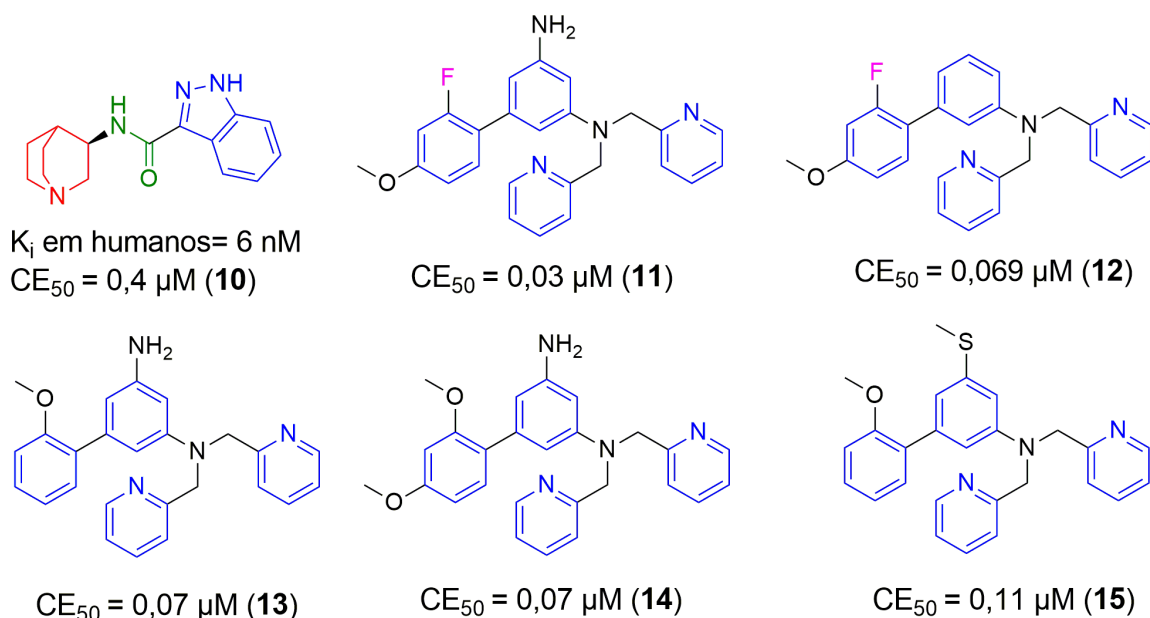


Figura 12 – Substâncias com atividade destacada frente aos nAChRs $\alpha 7$.

Fonte elaborada pela autora a partir da literatura (MAZUROV; SPEAKE; YOHANNES, 2011; HERNANDEZ; *et al.* 2019).

Além disso, são descritas na literatura diversas outras substâncias com atividade *in vitro* expressivas e seletivas em nAChRs do subtipo $\alpha 7$, destacando-se os exemplos a seguir (**Figura 13**).

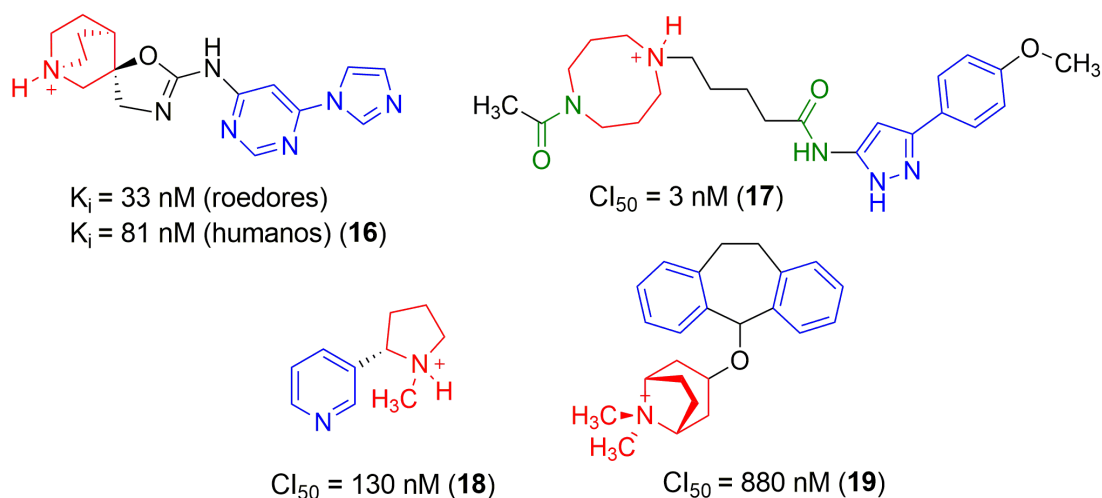


Figura 13 – Substâncias com atividade e potência destacadas frente aos nAChRs $\alpha 7$.

Fonte: elaborada pela autora a partir da literatura (BATISTA; NASCIMENTO–JÚNIOR, 2016; BRIGGS; MCKENNA, 1998; ZANALETTI; *et al.* 2012).

É possível observar algumas semelhanças entre as estruturas das substâncias **2–5** e **10–19**, como as subunidades aromáticas (em azul) e as subunidades contendo um átomo de nitrogênio básico ou carregado positivamente (em vermelho). Além disso, entre as estruturas **10–19** há semelhanças em anéis aromáticos substituídos por halogênios (em roxo) e, em verde, observa-se a subunidade amida. Estes grupos farmacofóricos podem contribuir de forma complementar para resultar na atividade *in vitro* observada na interação com o biorreceptor alvo (BATISTA; NASCIMENTO–JÚNIOR, 2016).

Baseando-se nas substâncias bioativas frente aos nAChRs $\alpha 7$ da literatura, conforme mostrado nas **Figuras 12** e **13**, foi possível propor uma classe de substâncias (**Figura 14**) (PIROLLA, 2018). O núcleo estrutural pirrolidínico (em vermelho) se deu pelas subunidades cíclicas, ou contendo um átomo de nitrogênio básico ou carregado positivamente. A subunidade bicíclica não é imprescindível para a atividade, o que permitiu planejamento de moléculas com estruturas mais simples (WANG; DONG; SHENG, 2019). Já as subunidades em azul foram base para introduzir subunidades aromáticas ou alifáticas, com o objetivo de que tenham interações semelhantes no reconhecimento molecular com a proteína alvo (LIMA; BARREIRO, 2005), além da presença de halogênios como substituintes do anel.

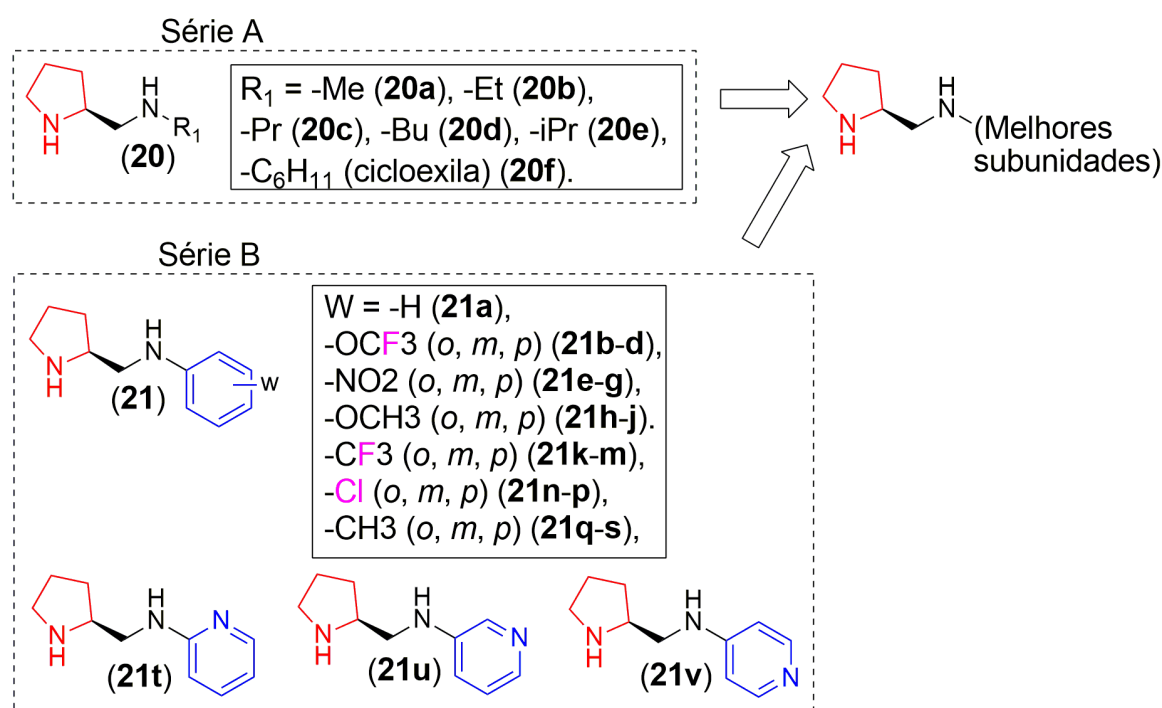


Figura 14 – Planejamento estrutural de 28 fragmentos moleculares com padrão estrutural pirrolidínico, planejados com ligantes dos nAChRs $\alpha 7$.
Fonte: elaborada pela autora adaptada de PIROLLA (2018).

Após estudos computacionais de ancoragem molecular realizados por PIROLLA (2019) com a proteína obtida no site *Protein Data Bank* (PDB) de código 5AFN, que analisou 28 compostos, tendo como base resíduos de aminoácidos-chave envolvidos nas interações ligante-proteína, e suas orientações espaciais, no sítio ortostérico do nAChRs $\alpha 7$, foram identificados os 8 melhores compostos (**Figura 15**) para a etapa de síntese.

Como observado nas estruturas planejadas, tanto as subunidades aromáticas quanto as que contêm um átomo de nitrogênio básico ou carregado positivamente, podem interagir com o biorreceptor alvo e contribuir de forma positiva para resultar na atividade *in vitro* frente aos nAChRs $\alpha 7$ (BATISTA; NASCIMENTO-JUNIOR, 2016; BRIGGS; *et al.* 1998; ZANALETTI; *et al.* 2012).

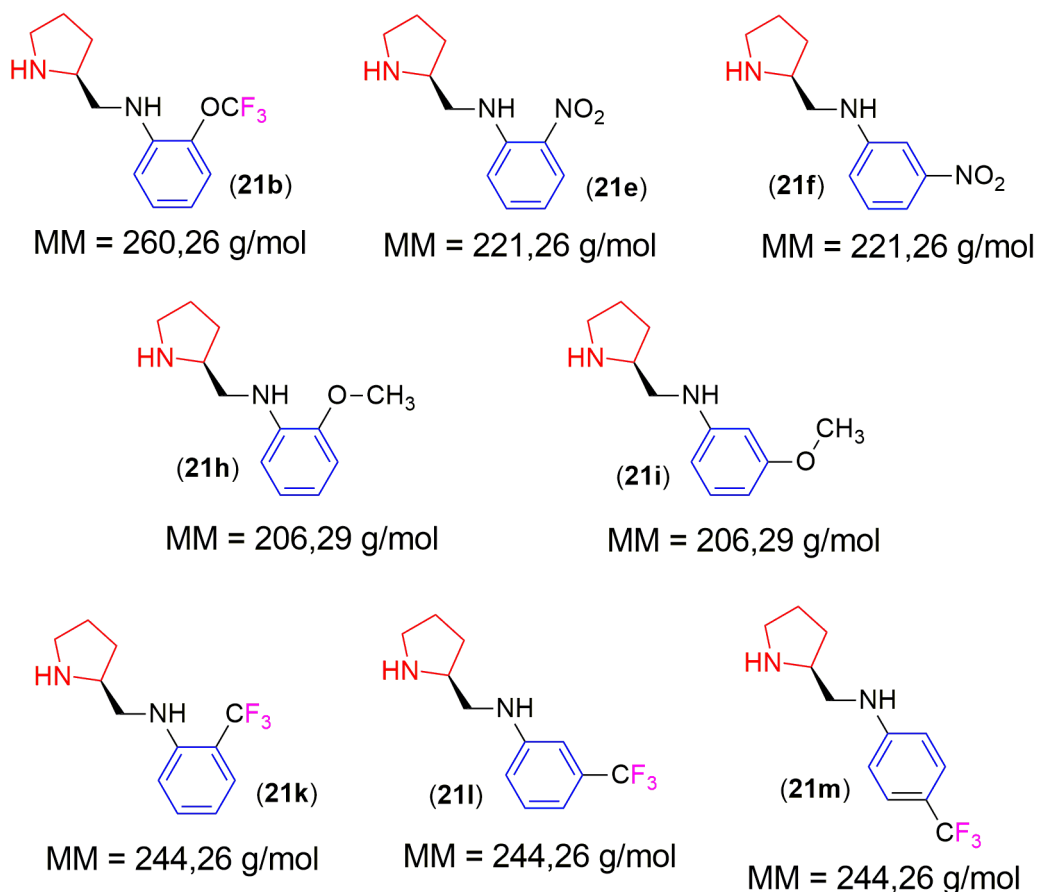


Figura 15 – Compostos de padrão pirrolidínico, selecionados com base nos estudos *in silico*, como candidatos a ligantes de nAChRs $\alpha 7$.

Fonte: elaborada pela autora a partir da literatura (PIROLLA, 2018).

Na Química Medicinal seguem-se algumas etapas para a pesquisa de um candidato a fármaco como: planejamento, desenvolvimento e caracterização analítica e farmacológica (IMMING, 2015). Esse processo é bastante longo, levando em média entre 10 e 15 anos (VAN NORMAN, 2016) e pode custar mais de 1 bilhão de dólares (DIMASI; *et al.* 2016). Duas técnicas comuns utilizadas pela indústria farmacêutica são: a química combinatória, uma metodologia que visa à rápida síntese de muitos compostos; e os testes em um alvo específico realizados com uma vasta biblioteca de estruturas chamado também de high-throughput screening (HTS) (LAVECCHIA; GIOVANNI, 2013; LIONTA; *et al.* 2014).

Essas estratégias, atualmente, ainda são muito utilizadas, porém observam-se alguns pontos negativos como, por exemplo, a necessidade de um alto investimento financeiro e um alto risco de falha. Em contraponto, vem surgindo novos métodos que se apresentam mais rápidos e racionais no desenvolvimento de fármacos como: avanços em técnicas de espectroscopia biomolecular, cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear e crio-microscopia eletrônica (MOITESSIER; *et al.* 2008). Além disso, uma abordagem que está sendo amplamente utilizada, nas indústrias e na academia, é a *structure-based drug design* (SBDD) que se baseia no conhecimento do arranjo topológico de alvos biológicos, para a incorporação de seus dados no processo de planejamento de ligantes desse alvo (MANDAL; *et al.* 2009; ANDRICOPULO; *et al.* 2009).

Considerando a SBDD, a ancoragem molecular, também conhecida como *docking*, é a técnica atualmente mais utilizada nesse campo de pesquisas (DE RUYCK; *et al.* 2016). A ancoragem tem uma ampla gama de aplicações como: triagem virtual de grandes bancos de dados de moléculas; otimização de estruturas com afinidade pelo alvo; e auxiliar a compreensão das características de reconhecimento biomolecular em um nível atômico. Essa técnica utiliza a estrutura tridimensional do alvo, que na maioria dos casos é uma proteína de interesse terapêutico, e tem como foco a predição das interações ligante-receptor utilizando métodos computacionais (MENG; *et al.* 2011; SALMASO; MORO, 2018). Dessa forma, na etapa de estudos *in silico*, nesta pesquisa de Mestrado, utilizou-se a técnica SBDD com ancoragem molecular para entender as interações dos ligantes com os nAChR $\alpha 7$.

2 OBJETIVOS

Esse projeto visa a obtenção de substâncias de padrão estrutural pirrolidínico, com atividade frente aos nAChRs do subtipo $\alpha 7$, que possam ser úteis na descoberta de novas alternativas para o tratamento da doença de Alzheimer, assim como outras doenças relacionadas à modulação desse biorreceptor.

Visando ampliar os derivados que podem ser obtidos, os intermediários de síntese, das 8 estruturas selecionadas, também foram considerados, para uma nova etapa computacional, para observar como eles podem interagir com o sítio ortostérico dos nAChRs do subtipo $\alpha 7$. Face ao exposto, os objetivos específicos são descritos a seguir:

- a) Síntese, isolamento, purificação e caracterização das 8 estruturas moleculares, assim como de seus respectivos intermediários de síntese;
- b) Ancoragem molecular e análise de 16 estruturas moleculares de padrão estrutural pirrolidínico frente aos nAChRs do subtipo $\alpha 7$.

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

A rota sintética planejada para a obtenção dos oito derivados de padrão estrutural pirrolidínico é exemplificada a seguir (**Figura 16**) para um dos possíveis fragmentos (**21**). Inicialmente, a *N*-(*t*-butoxicarbonil)-*L*-prolina (*Boc-L*-Prolina) (**22**) deve ser acoplada com anilinas funcionalizadas (**Figura 17**), utilizando hidroxibenzotriazol (HOBt), *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e diclorometano (DCM), para obtenção de **24** (DASH; *et al.* 2018). Em seguida o grupo protetor (*Boc*) pode ser removido por meio de tratamento em ácido trifluoroacético (TFA) e DCM (KNIGHT; STACHE; FERREIRA, 2014) formando o fragmento **25**. A última etapa consiste na redução da carbonila com LiAlH_4 em tetrahidrofurano (THF) para fornecer **21** (LI; *et al.* 2019). Essa rota mostra a viabilidade sintética na obtenção das substâncias planejadas.

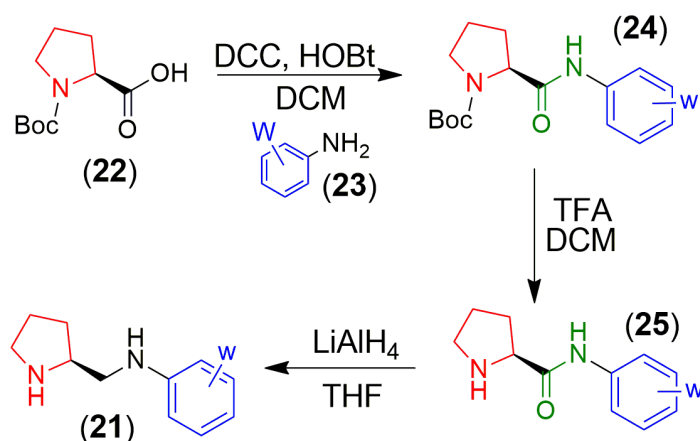


Figura 16 – Rota sintética planejada para a obtenção dos derivados de padrão estrutural pirrolidínicos.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

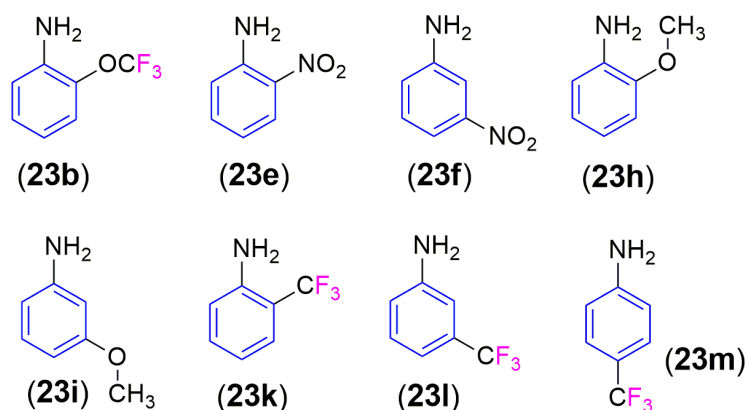


Figura 17 – Anilinas utilizadas na etapa de acoplamento.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

3.1 Reagentes e Solventes

As reações ocorreram em balões de fundo redondo com atmosfera inerte de argônio, sem necessidade de proteção contra luz e com solventes previamente secos. Os reagentes solventes e catalisadores (todos comercializados), por apresentarem elevada pureza, foram utilizados como adquiridos, exceto quando foram secados. Todos são listados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Reagentes, solventes e catalisadores utilizados na preparação dos compostos.

Reagente/ solvente/catalizador	Fórmula molecular	Estado físico em t. a.
<i>o</i>-anisidina	C ₇ H ₉ NO	líquido
<i>m</i>-anisidina	C ₇ H ₉ NO	líquido
DCC	C ₁₃ H ₂₂ N ₂	sólido
HOBT	C ₆ H ₅ N ₃ O	sólido
TFA	C ₂ HF ₃ O ₂	líquido
Diclorometano	CH ₂ CL ₂	líquido
THF	C ₄ H ₈ O	líquido
Hidreto de alumínio e lítio	LiAlH ₄	sólido
Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	sólido
Carbonato de potássio	K ₂ CO ₃	sólido
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	sólido
Hexano	C ₆ H ₁₄	líquido
Acetato de etila	C ₄ H ₈ O ₂	líquido
Metanol	CH ₃ OH	líquido
Trietilamina	C ₆ H ₁₅ N	líquido
<i>d</i>₁-clorofórmio	CDCl ₃	líquido
<i>d</i>₆-dimetilsulfóxido	C ₂ D ₆ OS	líquido

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

3.2 Caracterização

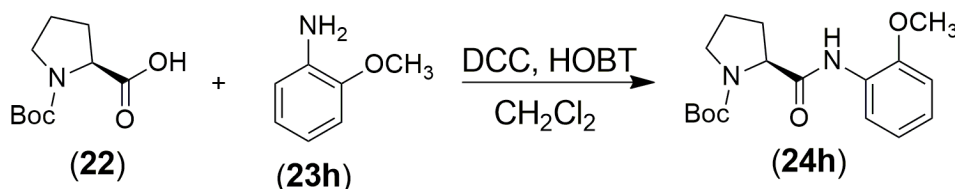
Os espectros de RMN ¹H foram coletados em espectrômetro Bruker 300 Fourier (7,1 T), com sonda de 5 mm e temperatura controlada de ~ 30 a 65 °C. A padronização interna foi efetuada com Si(CH₃)₄.

Os espectros de transmitância na região do IV foram registrados no espectrofotômetro *IR Prestige-21 Shimadzu®*, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, e as amostras foram preparadas em pastilhas de KBr.

As faixas de fusão foram determinadas em um equipamento de ponto de fusão capilar *Melting Point Apparatus SMP3*, Stuart Scientific®.

3.3 Síntese do intermediário 24h

Para a reação representada no **Esquema 1** partiu-se de uma suspensão, resfriada em banho de gelo, de *Boc-L*-prolina (0,1 g, 0,46 mmol) em CH₂Cl₂ (2,5 mL) em que foram adicionados DCC (0,106 g, 0,51 mmol) e HOBT (0,0691 g, 0,51 mmol), e a mistura foi agitada por 45 min a 0 °C. Em seguida, foi adicionada, gota a gota, a *o*-anisidina (52 µL, 0,46 mmol) em 1,8 mL de CH₂Cl₂ à mistura reacional, que foi então agitada por 20 h em temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel a combinação de hexano:acetato de etila (7:3) e revelação sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo, o produto bruto foi filtrado em Celite, lavado com DCM e concentrado sob pressão reduzida. Como método de purificação, foi realizada uma coluna cromatográfica, utilizando-se eluição em gradiente da mistura de hexano:acetato de etila (8:2 a 7:3), resultando em 116,7 mg de produto, na forma de sólido de cor amarela, com fator de retenção (R_f) de 0,51 (em hexano:acetato de etila 7:3) e rendimento de 78%. Intervalo de fusão (°C): 109,6–114,2.



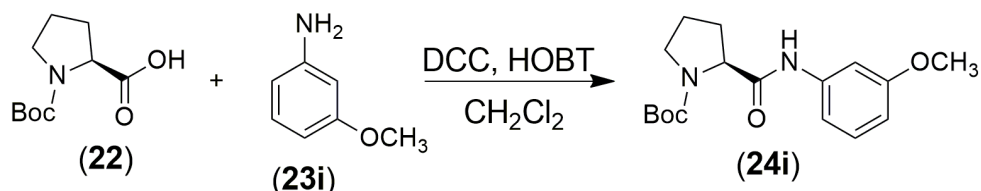
Esquema 1 – Reação de acoplamento para formar o intermediário 24h.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

3.4 Síntese do intermediário 24i

Para a reação representada no **Esquema 2** partiu-se de uma suspensão, resfriada em banho de gelo, de *Boc-L*-prolina (0,2 g, 0,92 mmol) em CH₂Cl₂ (5 mL), em que foram adicionados DCC (0,212 g, 0,10 mmol) e HOBT (0,1382 g, 0,10 mmol) e a mistura foi agitada por 60 min a 0 °C. Em seguida foi adicionada, gota a gota, a *m*-anisidina (0,1050 mL, 0,92 mmol) em 3,6 mL de CH₂Cl₂ à mistura reacional, que foi agitada por 24 h em temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como fase móvel a combinação de hexano:acetato de etila (7:3) e revelação sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo, a mistura reacional foi filtrada em Celite, lavada com DCM e concentrada sob pressão reduzida. Como

método de purificação foi realizada uma coluna cromatográfica, utilizando eluição em gradiente da mistura de hexano:acetato de etila (9:1 a 1:1), resultando em 209,5 mg de produto, como sólido de cor marrom, com R_f de 0,29 (em hexano:acetato de etila 7:3) e rendimento de 70%. Intervalo de fusão (°C): 163,2–167,8.

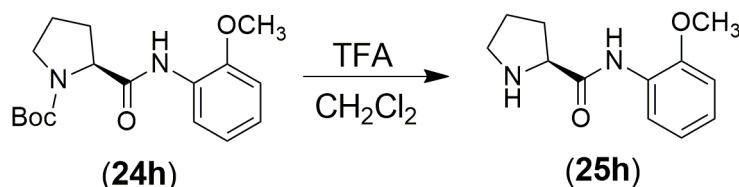


Esquema 2 – Reação de acoplamento para formar o intermediário **24i**.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

3.5 Síntese do intermediário **25h**

Para a reação representada no **Esquema 3** partiu-se de uma solução da amida **24h** (0,2954 g, 0,92 mmol) em CH₂Cl₂ (1,85 mL) e temperatura ambiente, em que foi adicionado TFA (1,43 mL, 18,5 mmol). A solução foi agitada em temperatura ambiente por 1 h e 40 min, e após a conclusão, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto bruto foi dissolvido em CH₂Cl₂ (1,8 mL) e foi adicionada água (1 mL). A mistura foi basificada com K₂CO₃ sólido até pH = 9 e, em seguida, foi extraída com CH₂Cl₂. As frações orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄ anidro e concentradas para proporcionar 176,9 mg da substância **25h** como um sólido de cor marrom, com R_f de 0,06 (em hexano:acetato de etila 1:1) e rendimento de 86%, visto que **25h** estava suficientemente puro para ser levado à próxima etapa. Intervalo de fusão (°C): 76,9–81,5.

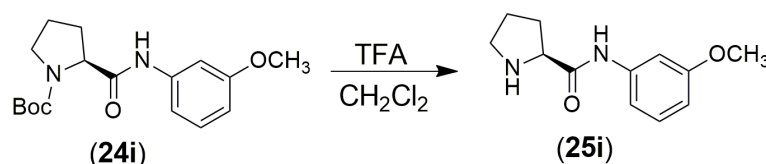


Esquema 3 – Remoção do grupo protetor para formar o intermediário **25h**.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

3.6 Síntese do intermediário 25i

Para a reação representada no **Esquema 4** partiu-se de uma solução da amida **24i** (0,2095 g, 0,65 mmol) em CH_2Cl_2 (1,3 mL), em temperatura ambiente, em que foi adicionado TFA (1 mL, 12,9 mmol). A solução foi agitada em temperatura ambiente por 2 h, e após a conclusão, o solvente foi removido sob vácuo. O produto foi dissolvido em CH_2Cl_2 (1,3 mL) e foi adicionada água (0,7 mL). A mistura foi basificada com K_2CO_3 sólido até pH = 10 e, em seguida, foi extraída com CH_2Cl_2 . As frações orgânicas combinadas foram secas com Na_2SO_4 e concentradas por evaporação rotativa para a obtenção de 128,0 mg do derivado **25i**, como um óleo amarelo, com R_f de 0,09 (em hexano:acetato de etila 1:1) e rendimento de 88%, que estava suficientemente puro para ser levado para a próxima etapa.

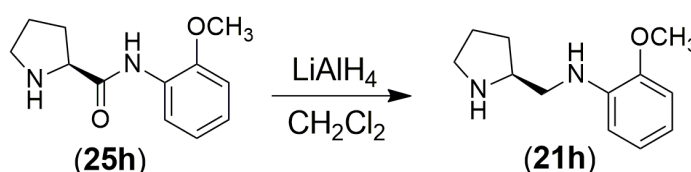


Esquema 4 – Remoção do grupo protetor para formar o intermediário **25i**.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

3.7 Síntese do produto final 21h

Para a reação representada no **Esquema 5** partiu-se de uma solução contendo o intermediário **25h** (0,1554 g, 0,70 mmol) em THF (7,1 mL) e a 0 °C, em que foi adicionado LiAlH_4 (0,1073 g, 2,8 mmol). Após agitação à temperatura ambiente por 24 h, foram adicionados 4,1 mL de água e solução saturada de NaHCO_3 (4,1 mL) para encerrar a reação. A mistura passou então por filtração simples e extração líquido/líquido com acetato de etila, além de secagem com Na_2SO_4 anidro. Em seguida, a fase orgânica foi concentrada sob pressão-reduzida e diversos eluentes foram testados para melhor visualização da CCD.

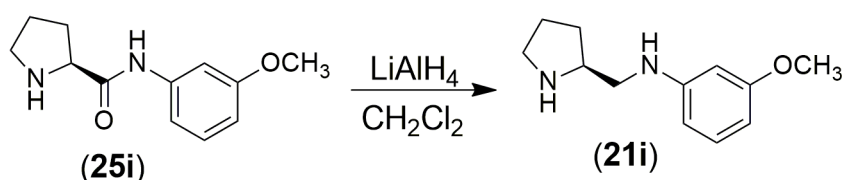


Esquema 5 – Reação de redução de amida para formar o intermediário **21h**.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

3.8 Síntese do produto final 21i

Para a reação representada no **Esquema 6** partiu-se de uma solução contendo o intermediário **25h** (0,1088 g, 0,49 mmol) em THF (4,5 mL) e a 0 °C, em que foi adicionado LiAlH_4 (0,0751 g, 1,97 mmol). Após agitação à temperatura ambiente durante 24 h, foram adicionados 2,9 mL de água e solução saturada de NaHCO_3 (2,9 mL) para encerrar a reação. A mistura passou então por filtração simples e extração líquido/líquido com acetato de etila, além de secagem com Na_2SO_4 anidro. Em seguida, a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida e diversos eluentes foram testados para melhor visualização da CCD.



Esquema 6 – Reação de redução de amida para formar o intermediário **21i**.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

3.9 Ancoragem Molecular

Todos os cálculos foram realizados em uma estação de trabalho com sistema operacional Windows 10, processador Intel® Core™ i7–8700, CPU de 3,20 GHz, base 64 bits (x64) e 16 GB de memória RAM da marca DELL.

Os estudos computacionais complementares foram baseados em uma metodologia já desenvolvida pelo aluno Victor de Souza Batista do grupo de pesquisa do LaQMedSOMM. Para a proteína em questão, foi realizada validação da metodologia através da reancoragem no programa *GOLD Suite*, o mesmo utilizado na ancoragem desta pesquisa (BATISTA, 2019; TAHA; *et al.* 2011). Apesar da utilização da proteína de código PDB 5AFN nos estudos prévios, que determinaram os 8 melhores fragmentos para etapa de síntese deste trabalho, a ancoragem molecular desta dissertação foi realizada com a proteína de código PDB 5AFH. Essa mudança se deu, pois se identificou que a estrutura 5AFN contém fragmentos de ligantes alostéricos, enquanto 5AFH apenas ligantes nos sítios ortostéricos. Como na literatura não se sabe exatamente se os ligantes alostéricos, dessa proteína, alteram algum aspecto no sítio ativo alvo (ortostérico) que possa ser relevante para

as interações ligante-proteína, optou-se por usar a 5AFH, que possui, inclusive, mesma resolução do que 5AFN.

Além disso, ressalta-se que o resíduo-chave W53 é altamente conservado entre os nAChRs $\alpha 7$ e outros nAChRs. Dessa forma, é provável que o resultado de cristalografia realizada pelo trabalho que determinou a estrutura de código 5AFH seja o modelo mais realista para a compreensão do reconhecimento do ligante nos nAChRs nativos. (SPURNY; *et al.* 2015).

A estrutura cristalográfica da proteína ligante da ACh (PDB ID: 5AFH), é uma proteína quimérica entre a AChBP da espécie *Lymnaea stagnalis* e o domínio extracelular do nAChRs $\alpha 7$ humano, com 71% de similaridade perante à proteína humana nativa e está co-cristalizada com **2**. Ela foi obtida a partir do PDB, para a qual estão definidas as coordenadas de referência ($x = 38.5534$, $y = -15.7578$ e $z = -1.4681$) para o sítio de ligação utilizado, que se encontra entre as cadeias B compondo o lado principal do sítio ativo e C que é a subunidade complementar do mesmo (Figura 17). Esse sítio foi escolhido, pois nele há ligação dissulfeto nessa região, diferente do que ocorre entre as cadeias A e B. Além disso, ele destaca-se na plasticidade do bolso de ligação permitindo orientações de ligação distintas de **2** em diferentes complexos da proteína. Isso pode auxiliar na acomodação de outros ligantes em diferentes modos de ligação, apesar do arranjo semelhante de resíduos aromáticos altamente conservados (SPURNY; *et al.* 2015).

A estrutura apresenta resolução de 2,15 Å e a técnica utilizada para sua elucidação foi a difratometria de raios X. A 5AFH tem massa molecular de cerca de 38 kDa e uma cadeia polipeptídica composta por 205 aminoácidos. Sua estrutura é homopentamérica e apresenta cinco sítios ortostéricos iguais, localizados entre as subunidades alfa, sendo os resíduos de aminoácidos importantes (aqueles que realizam interações com o ligante co-cristalizado): Y91, W53, W145, Y186, Y193, Y184, Y191 (SPURNY; *et al.* 2015).

Após obtenção da proteína, ela foi analisada pelo gráfico de Ramachandran (**Figura 24**) para verificar os ângulos diédricos phi (ϕ) e psi (ψ) (BATISTA, 2019). Então, os 16 ligantes definidos (**Figura 18**) foram construídos utilizando o programa *Discovery Studio Visualizer* (DSV/Versão: 17.2.0), por meio do qual os ângulos de ligação foram otimizados com a função *Clean Geometry*. Em seguida o estado de protonação de cada ligante foi determinado em pH 7,4, levando em consideração o

pH fisiológico (normal) do sangue humano que deve ficar entre 7,35 - 7,45 (NELSON; *et al.* 2014) pelo programa computacional *MarvinSketch* versão 17.2.27.

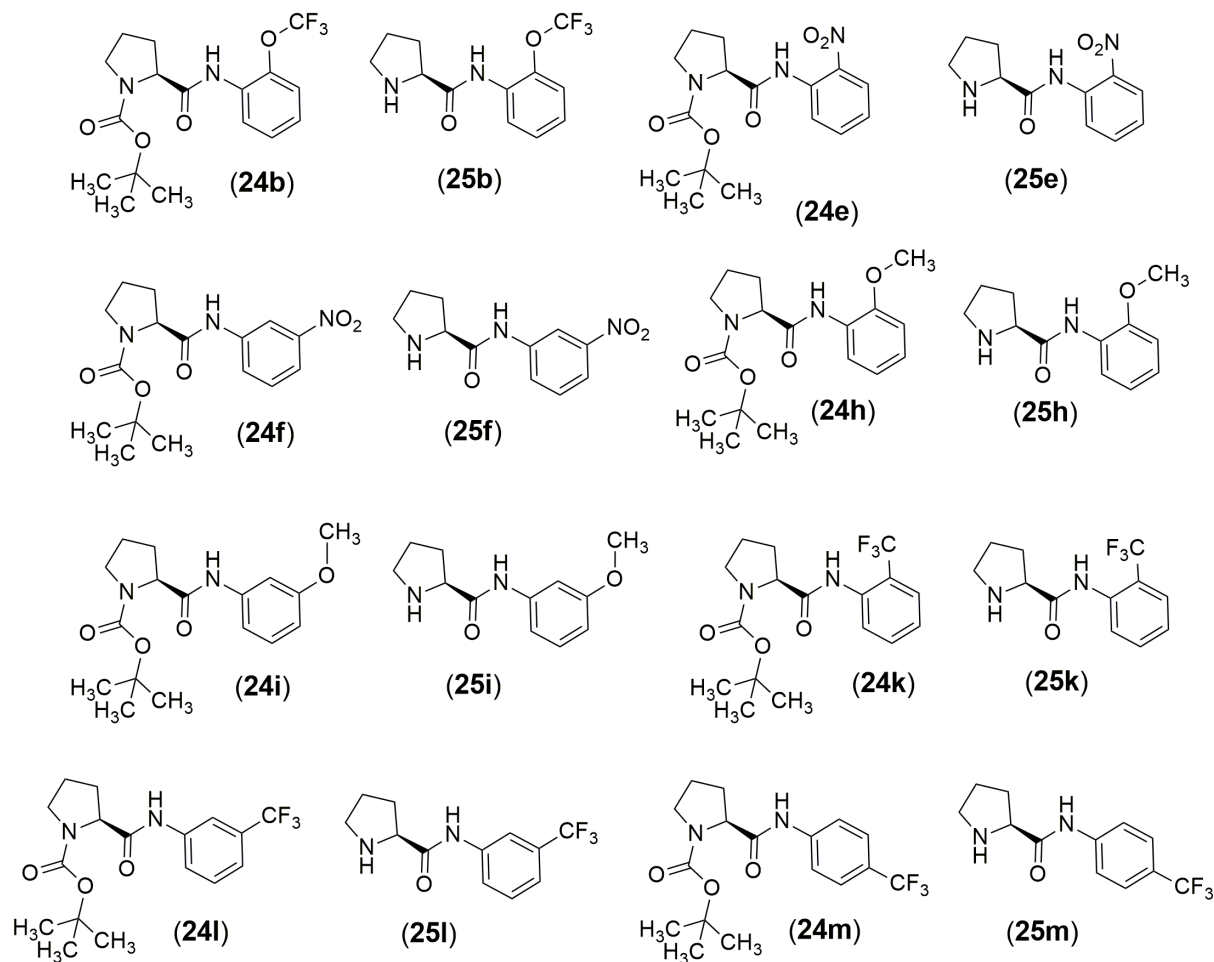


Figura 18 – 16 fragmentos intermediários da reação.

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

Sabendo que a estrutura cristalográfica está co-cristalizada com **2** e que há uma metodologia já validada, de reancoragem, para ancoragem molecular com essa estrutura (receptor-ligante) (BATISTA, 2019; TAHA; *et al.* 2011), os parâmetros de ancoragem molecular desta pesquisa seguiram as etapas seguintes: abriu-se o arquivo *.pdb no programa *GOLD Suite* (v.5.7.2) e submeteu-o ao estudo de ancoragem no modo rígido, avaliando-se a função de pontuação ChemPLP (função que apresentou melhor resultado na validação), que utiliza uma função de potencial chamada *Piecewise Linear Potential* para modelar complementariedades estéricas entre o ligante e a enzima, com os termos de ligações metálicas e de hidrogênio dependentes de distância e ângulo (KORB, STÜTZLE, EXNER; 2009).

Nesta etapa de ancoragem os átomos de hidrogênio foram adicionados, pois não estavam presentes na estrutura cristalográfica. As moléculas de água foram removidas e os ligantes foram extraídos. Em seguida determinou-se a posição do átomo de referência com base na localização de **2**, cujas coordenadas foram $x = -20,8987$, $y = -10,0015$ e $z = 8,5084$ e definiu-se o raio em 10 Å, que é pouco mais que a metade do tamanho da maior molécula utilizada nas simulações computacionais. Por fim o número de poses foi alterado para 50. Os 16 ligantes foram então adicionados ao programa e o cálculo iniciou. Após a ancoragem, salvou-se a melhor pose de cada ligante.

Posteriormente, as poses de ancoragem com melhor pontuação em cada ligante foram analisadas com os programas *Discovery Studio* e o *PyMol* (v. 2.3), sendo analisadas as interações: hidrofóbica (σ - π , π -alquil), hidrofóbica (empilhamento-T, empilhamento- π), hidrofóbica (π -enxofre), ligações de hidrogênio clássicas e não clássicas e ligação de halogênio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas subseções a seguir serão apresentados e discutidos os resultados da etapa experimental e computacional, juntamente com as caracterizações dos quatro fragmentos sintetizados.

4.1 Reações de acoplamento

Seguindo a metodologia de DASH; *et al.* (2018) diversos testes foram realizados para se obter as melhores condições da reação de acoplamento com **24h-i**. Após diversas tentativas, percebeu-se que quanto maior a quantidade de reagentes, maior foi o rendimento. Além disso, o tempo indicado no artigo para a agitação em temperatura ambiente (*overnight*, 12 h) não foi suficiente para um total consumo dos reagentes. Dessa forma, aumentou-se o tempo de reação.

Esse tipo de reação ocorre seguindo o mecanismo representado na **Figura 19**. Inicialmente o nitrogênio do DCC abstrai um hidrogênio do grupo ácido da *Boc-L*-prolina. Dessa forma o átomo de oxigênio passa a ter uma carga negativa, agindo como nucleófilo e se ligando ao carbono do DCC. Com isso, o carbono da carbonila fica defasado em densidade eletrônica, facilitando a formação de uma nova ligação com o nitrogênio da *o*-anisidina. Forma-se então um intermediário com um bom grupo abandonador chamado dicicloexilureia, que se desliga da molécula principal, para a última etapa de desprotonação do nitrogênio, fornecendo **24**.

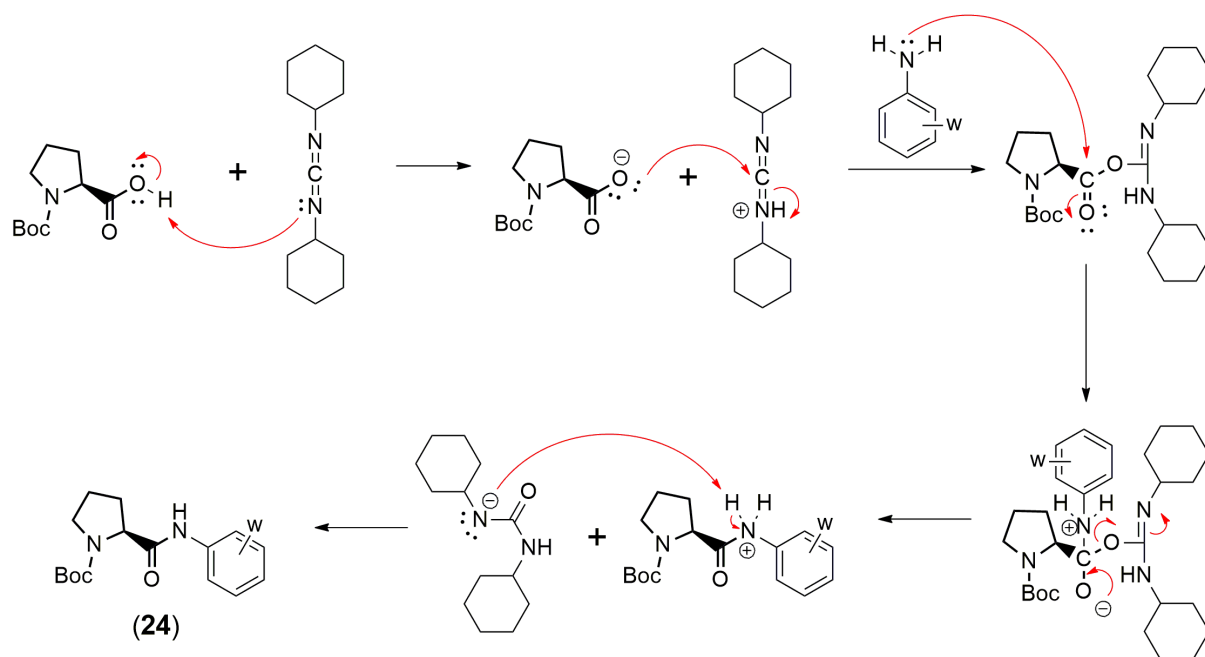


Figura 19 – Mecanismo geral de reação de acoplamento com DCC.
Fonte: elaborada pela autora, 2021.

4.2 Reações de retirada do grupo protetor Boc

Foram testadas duas metodologias diferentes, para a escolha da melhor em relação a tempo, rendimento e proporção entre reagentes. Com isso, concluiu-se que a metodologia com melhor rendimento e em menor tempo foi de Knight e colaboradores (2014).

4.3 Reações de redução da amida

Algumas metodologias foram testadas para a realização desta última etapa de síntese, objetivando a obtenção dos fragmentos **24h–i**. A que se demonstrou mais promissora foi a de Li e colaboradores (2019), principalmente por partir do mesmo intermediário deste projeto (**25h**) a fim de se obter o mesmo produto. Porém, como resultado, os *spots* observados nas placas cromatográficas das duas reações realizadas eram muitos e além de se apresentarem desfocados, com todos os eluentes testados, estavam muito próximos.

Dessa forma realizou-se duas tentativas de purificação do produto **24h**, através de colunas cromatográficas. A primeira teve como eluente DCM:metanol (20:1) e não foi eficaz, pois os produtos não se separaram. Na segunda, utilizou-se

como fase móvel acetato de etila:hexano:metanol:triethylamina (50:37:10:3) e, inicialmente, pensou-se ter isolado o *spot* mais polar (que permanecia próximo a base da placa). Porém, após utilizar o revelador de ácido fosfomolibdico foi possível observar mais de um *spot* nessa amostra. Com isso, até o momento, não foi possível fazer o isolamento, purificação e caracterização dos produtos **24h** e **24i**.

Esse tipo de reação ocorre seguindo o mecanismo representado na **Figura 20**. Inicialmente, um hidrogênio do hidreto de alumínio e lítio abstrai o outro da amida formando uma ligação dupla entre carbono e nitrogênio. Dessa forma o átomo de oxigênio passa a ter uma carga negativa, agindo como nucleófilo e se ligando ao alumínio. Em seguida o carbono da amida forma uma ligação com um dos hidrogênios do alumínio, resultando em um bom grupo abandonador que se desligará da molécula principal na próxima etapa. Após esse desligamento o carbono abstrai um hidrogênio de uma nova molécula de LiAlH_4 , formando o intermediário **19**.

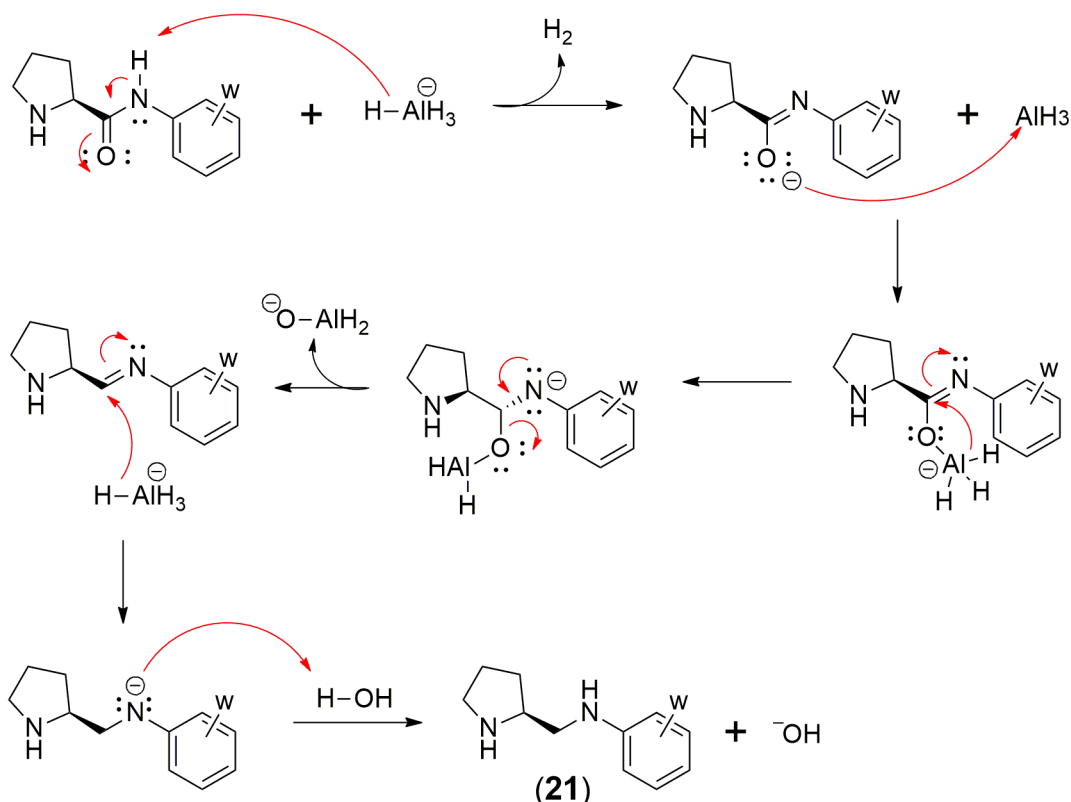


Figura 20 – Mecanismo geral de reação de redução de amida com LiAlH_4 .
Fonte: elaborada pela autora, 2021.

4.4 Caracterização

A caracterização foi realizada através de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H para as quatro estruturas. A **Tabela 3**, localizada ao final do tópico, apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos compostos **24h-i** e **25h-i**.

Foram realizadas também análises de Infravermelho (IV) e ponto de fusão das substâncias **24h**, **24i** e **25h** no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus Araraquara, pela mestrandia Maria Gabriela Deberaldini.

A substância **25i** se encontrava na forma de óleo e em quantidade insuficiente para realização da análise de IV.

4.4.1 Caracterização do intermediário **24h**

Como mostrado na **Figura 21**, a soma das integrais dos sinais apresentados é de 27 hidrogênios, enquanto a quantidade esperada no intermediário **24h** é de 24. Essa diferença pode ser explicada pela presença de água.

Observa-se um sinal pouco intenso e largo entre 9,0 e 9,5 partes por milhão (ppm), possivelmente atribuído ao hidrogênio amidico, porém, não foi possível integrá-lo. O provável motivo seria o caráter ácido do solvente utilizado que foi clorofórmio deuterado (CDCl_3), que pode resultar na troca de íons hidrônio pelo hidrogênio, dificultando a visualização do sinal. Porém, pode-se evidenciar a obtenção do produto desejado comparando-se esse espectro com o do reagente *o*-anisidina, que quando não acoplado possui um sinal simpleto com deslocamento aproximado de 3,6 ppm, integrando para 2.

Os hidrogênios do grupo metoxila se apresentam como simpleto, integrando para 3, em deslocamento químico (δ) = 3,86 ppm. Os hidrogênios aromáticos estão entre 6,5 e 8,5 ppm, apresentando-se como multipletos, com integração total em 4 hidrogênios.

Tem-se em 1,45 ppm o deslocamento médio dos hidrogênios das metilas do grupo protetor *Boc*, apresentando-se como um duplete e integrando para 9 hidrogênios. Nota-se um multiplete referente aos hidrogênios ligados ao carbono 6 com deslocamentos entre 3,24 e 3,69 ppm e outro referente ao hidrogênio do centro

estereogênico com deslocamento entre 4,33 e 4,48 ppm. Por fim, os hidrogênios dos carbonos 7 e 8 são representados no multipeto entre 1,6 e 2,6 ppm, evidenciados pela integração total de 4 átomos.

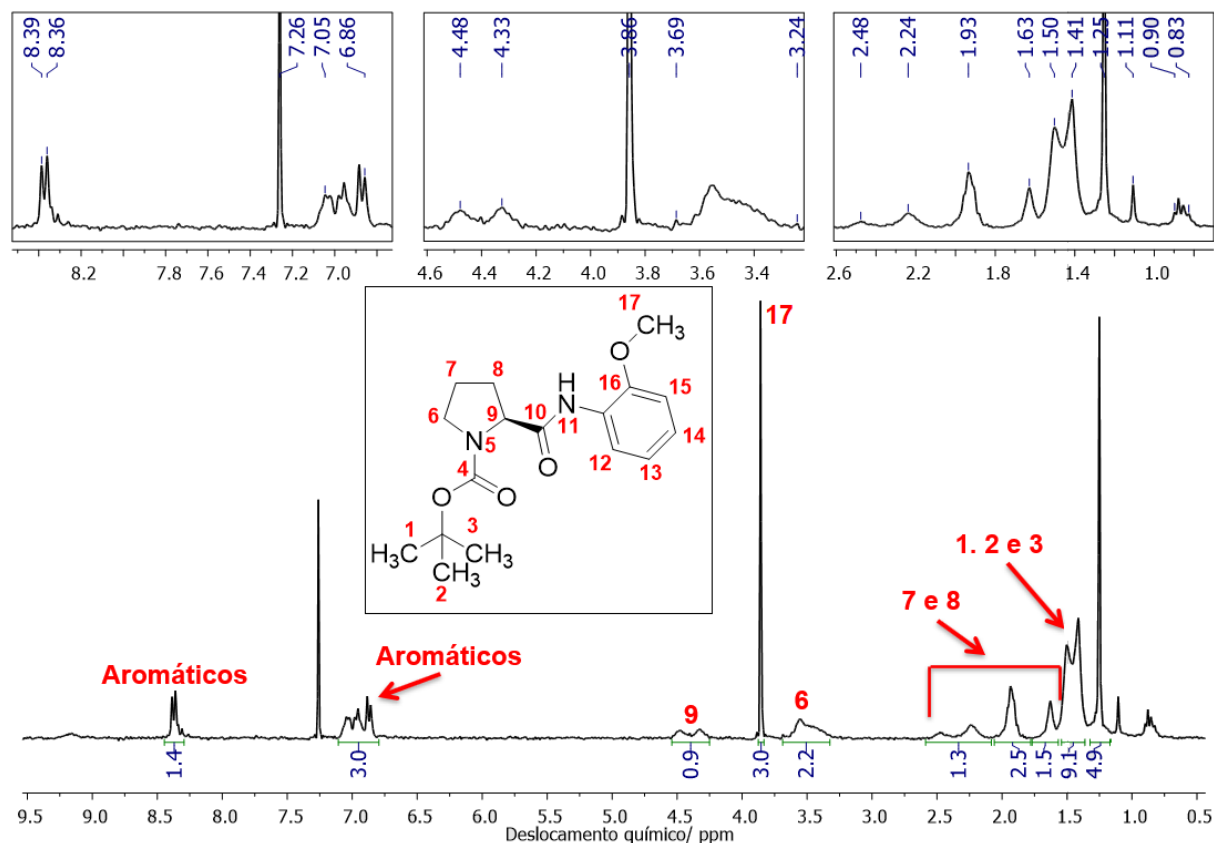


Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H do intermediário **24h** (300 MHz, CDCl_3).
Fonte: elaborada pela autora, 2021.

O espectro vibracional na região do IV do composto **24h** é apresentado na **Figura 22**. Os principais modos vibracionais, indicativos da formação do composto em questão são: estiramento N–H em $3313,71\text{ cm}^{-1}$, característico da formação da amida; e estiramentos C=O em $1739,79$ e $1676,14\text{ cm}^{-1}$. Neste ultimo caso, nota-se um pico consideravelmente alargado envolvendo a região da carbonila, no espectro, fato indicativo de possíveis interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio, no estado sólido.

Na faixa espectral entre 3200 a 2840 cm^{-1} , aproximadamente, há picos referentes aos estiramentos C–H alifáticos, típicos dos grupos presentes na molécula formada. Inclusive não é notado sinal característico do grupo O–H (de ácido carboxílico), nesta região, que apareceria caso a *Boc-L*-Prolina (**22**) não tivesse reagido.

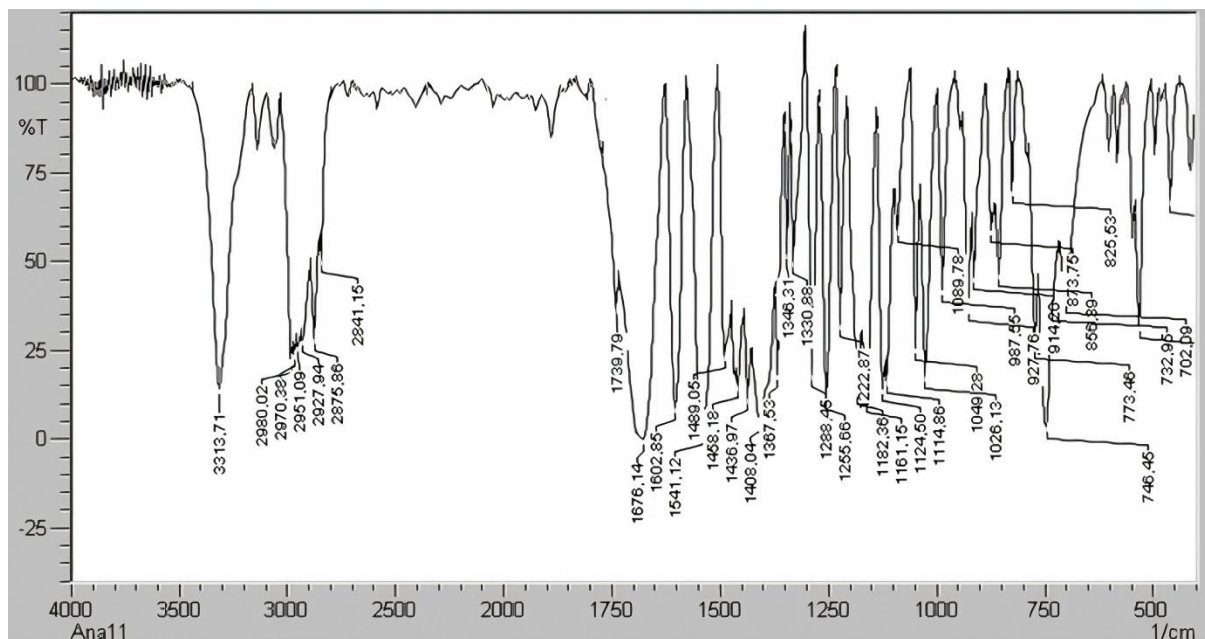


Figura 22 – Espectro vibracional no IV do composto **24h**.

Fonte: figura gerada por Maria Gabriela Deberaldini, 2021.

4.4.2 Caracterização do intermediário **24i**

Observa-se na **Figura 23** que a soma das integrais dos sinais apresentados é de 24 hidrogênios, a mesma quantidade esperada para o intermediário **24i**. Porém, como no intermediário **24h**, é possível observar um sinal (não integrado) pouco intenso e largo entre 9 e 9,5 ppm, que pode ser o hidrogênio da amida. Dessa forma o número total da integração dos sinais inclui a molécula de água. A efetividade do acoplamento segue a mesma explicação exposta na análise do intermediário **24h**.

Os hidrogênios do grupo metoxila apresentam-se como simpleto, integrando para 3 hidrogênios em $\delta = 3,86$ ppm. Os hidrogênios aromáticos estão entre 6,7 e 8,5 ppm, apresentando-se como multipletos com integração total resultando em 4 hidrogênios.

Tem-se em 1,46 ppm o deslocamento médio dos hidrogênios das metilas do grupo protetor *Boc*, apresentando-se como um duplete e integrando para 9 hidrogênios. Observa-se um multiplete referente aos hidrogenios ligados ao carbono 6 com deslocamento entre 3,33 e 3,69 ppm e outro referente ao hidrogênio do centro estereogênico com deslocamento entre 4,33 e 4,48 ppm. Por fim, os hidrogênios dos carbonos 7 e 8 são representados nos multipletos entre 1,6 e 2,5 ppm, evidenciados pela integração total de 4 átomos.

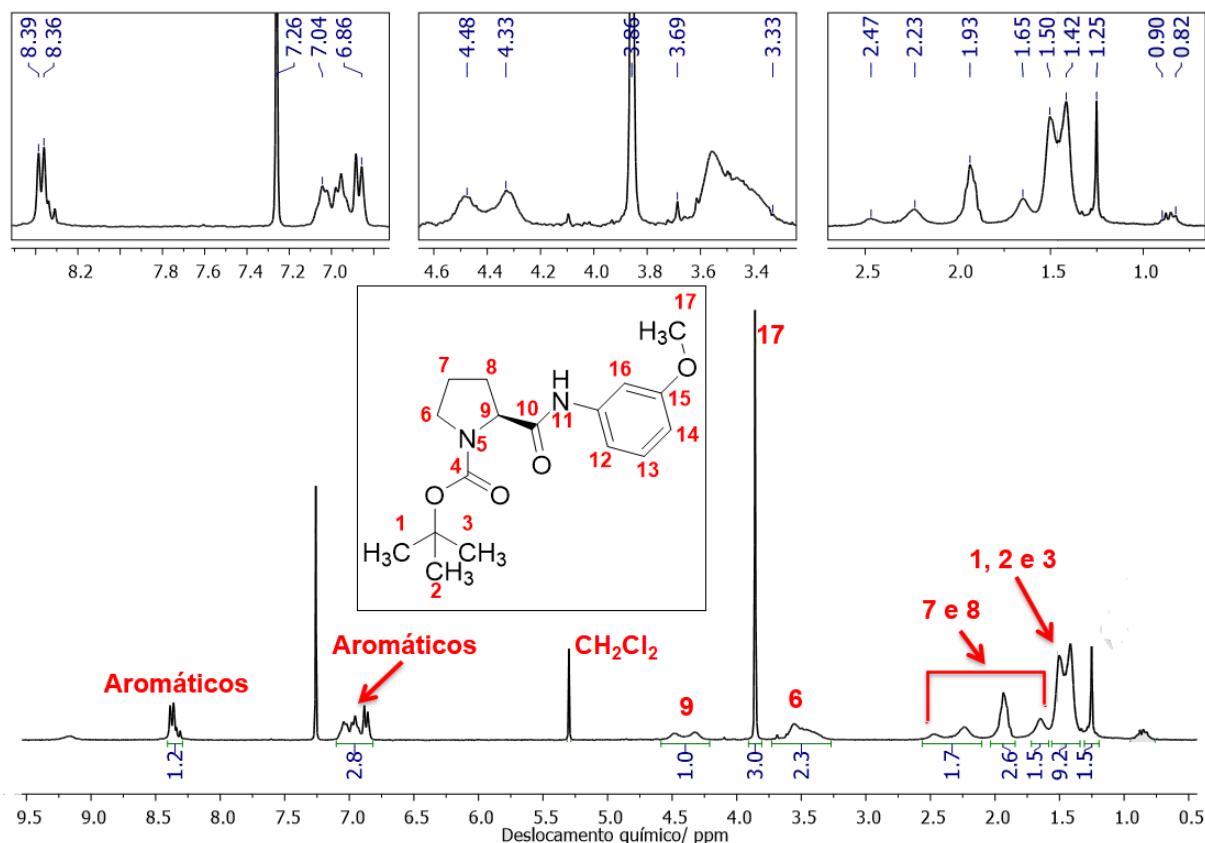


Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H do intermediário **24i** (300 MHz, CDCl_3).

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

O espectro vibracional na região do IV do composto **24i** é apresentado na **Figura 24**. Os principais modos vibracionais, indicativos da formação do composto em questão são: estiramento N–H em $3282,84\text{ cm}^{-1}$, característico da formação da amida; e estiramentos C=O em $1699,29$ e $1662,64\text{ cm}^{-1}$.

Tanto para o grupo N–H como para as carbonilas, percebe-se-se picos ligeiramente desdobrados, fato possivelmente atribuído aos episódios de interações intermoleculares.

Na faixa espectral entre 3200 a 2835 cm^{-1} , aproximadamente, há picos referentes aos estiramentos C–H alifáticos, típicos dos grupos presentes na molécula formada.

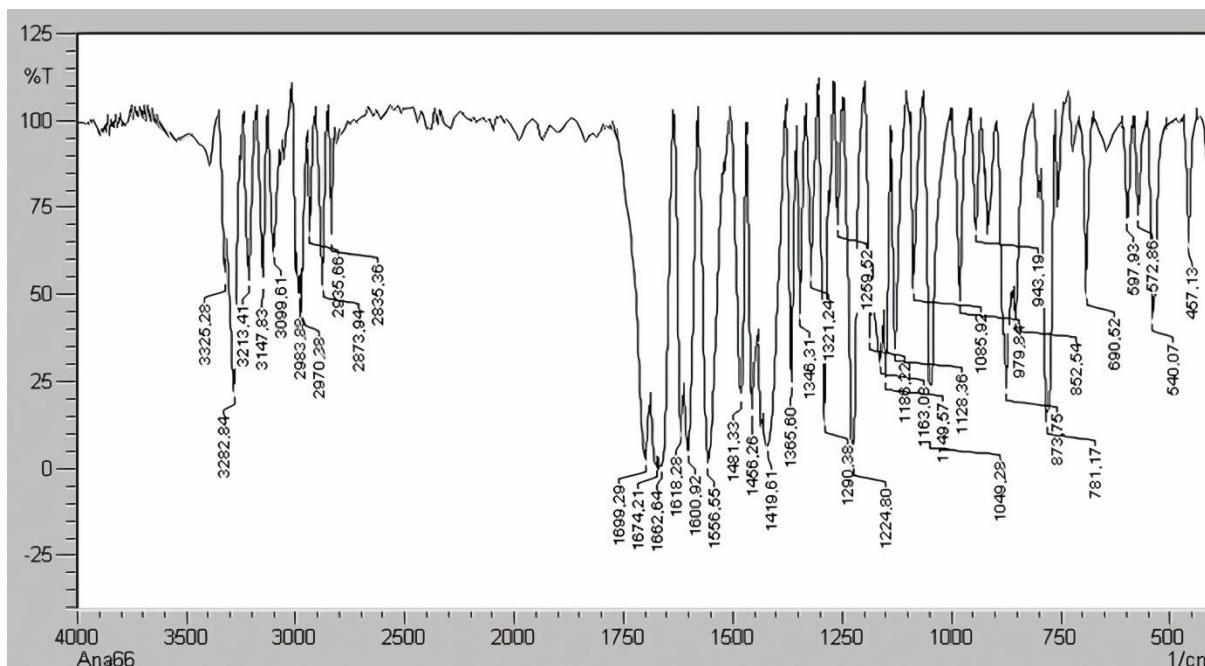


Figura 24 – Espectro vibracional no IV do composto **24i**.

Fonte: figura gerada por Maria Gabriela Deberaldini, 2021.

4.4.3 Caracterização do intermediário **25h**

Na **Figura 25**, observa-se que a soma das integrais dos sinais apresentados é de 16 hidrogênios (desconsiderando a água), que é a mesma quantidade esperada para o intermediário **25h**. Diferente dos intermediários **24h–i**, é possível observar um simpleto em 9,92 ppm, referente ao hidrogênio da amida devido a utilização do solvente DMSO- d_6 .

Os hidrogênios da metila do grupo metoxila apresentam-se como simpleto, integrando para 3 hidrogênios em 3,72 ppm. Os hidrogênios aromáticos estão entre 6,5 e 7,5 ppm, apresentando-se como multipletos com integração total resultando em 4 hidrogênios.

Não há sinais com integração de 9, evidenciando a saída do grupo protetor *Boc*. Observa-se um tripleto referente aos hidrogênios ligados ao carbono 6 com deslocamento médio de 2,88 ppm. Este tripleto está sobreposto a um simpleto com integração de 1 e deslocamento exato de 2,88 ppm referente ao hidrogênio da amina. Há também um multipletto entre 3,64 e 3,72 ppm e integração de 1, indicando o hidrogênio do centro estereogênico. Por fim, os hidrogênios dos carbonos 7 e 8 são representados respectivamente nos multipletos entre 1,59 a 1,68 ppm e 1,71 a 2,09 ppm, evidenciados pela integração total de 4 átomos.

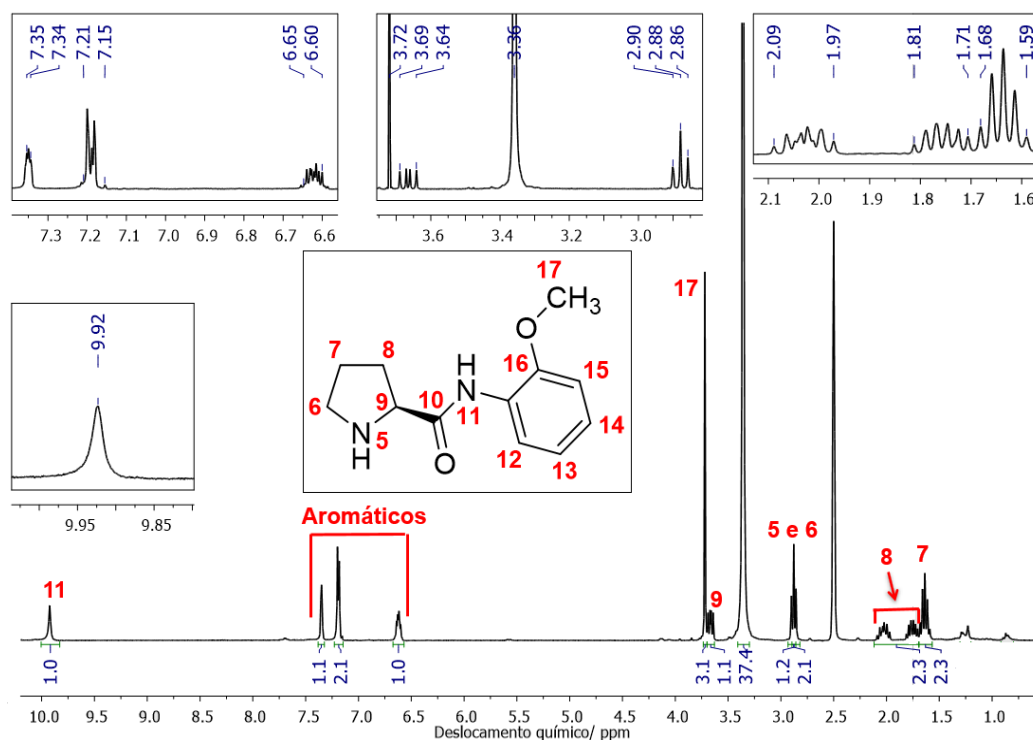


Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H do intermediário **25h** (300 MHz, DMSO-d_6).
Fonte: elaborada pela autora, 2021.

O espectro vibracional na região do IV do composto **25h** é apresentado na **Figura 26**. Os principais modos vibracionais, indicativos da formação do composto em questão são: estiramento N–H em $3340,71$ e $3230,77\text{ cm}^{-1}$, característico da formação da amida e da saída do grupo *Boc*, gerando um N–H amínico na porção pirrolidínica; e estiramento C=O em $1666,50\text{ cm}^{-1}$, referente a porção amídica da molécula.

Na faixa espectral entre 2970 a 2860 cm^{-1} , aproximadamente, há picos referentes aos estiramentos C–H alifáticos, típicos dos grupos presentes na molécula formada. Por outro lado, não há clareza da presença de picos referentes aos grupos C–H aromáticos, pois estes podem estar encobertos pelo alargamento dos picos C–H alifáticos.

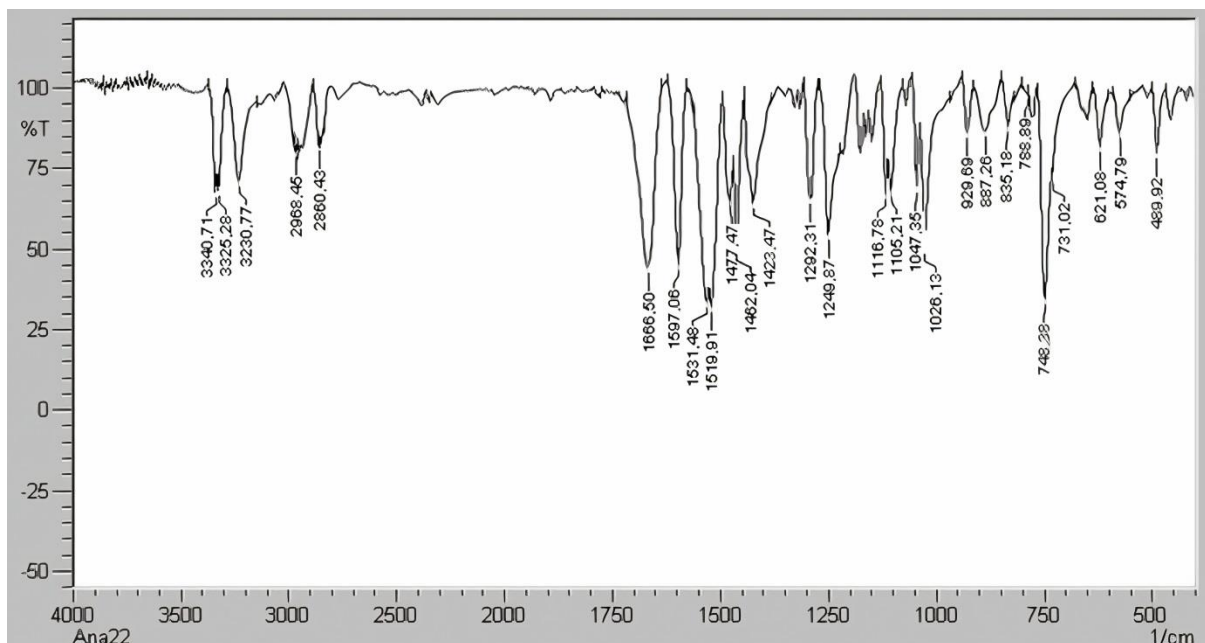


Figura 26 – Espectro vibracional no IV do composto **25h**.

Fonte: figura gerada por Maria Gabriela Deberaldini, 2021.

4.4.4 Caracterização do intermediário **25i**

Observa-se na **Figura 27** que a soma das integrais dos sinais apresentados é de 15 hidrogênios, enquanto a quantidade esperada no intermediário **25i** é de 16. Essa diferença é explicada pelo sinal do hidrogênio da amina que não aparece. É possível observar um simpleto em 10,19 ppm, referente ao hidrogênio da amida devido a utilização do solvente DMSO- d_6 .

Os hidrogênios do grupo metoxila apresentam-se como simpleto, integrando para 3 em 3,85 ppm. Os hidrogênios aromáticos estão entre 6,8 e 8,4 ppm, apresentando-se como multipletos com integração total resultando em 4 hidrogênios.

Não há sinais com integração de 9, evidenciando a saída do grupo protetor *Boc*. Observa-se um multipeto referente aos hidrogenios ligados ao carbono 6 com deslocamento entre 2,73 e 3,01 ppm e integração de 2. Há também um multipeto entre 1,75 e 2,09 ppm e integração de 2, indicando o hidrogênios do carbono 8, e outro entre 1,58 e 1,67 ppm, referente aos hidrogênios do carbono 7. Por fim, o hidrogênio do centro estereogênico está representado pelo multipeto entre 3,70 e 3,75 ppm com integração de 1.

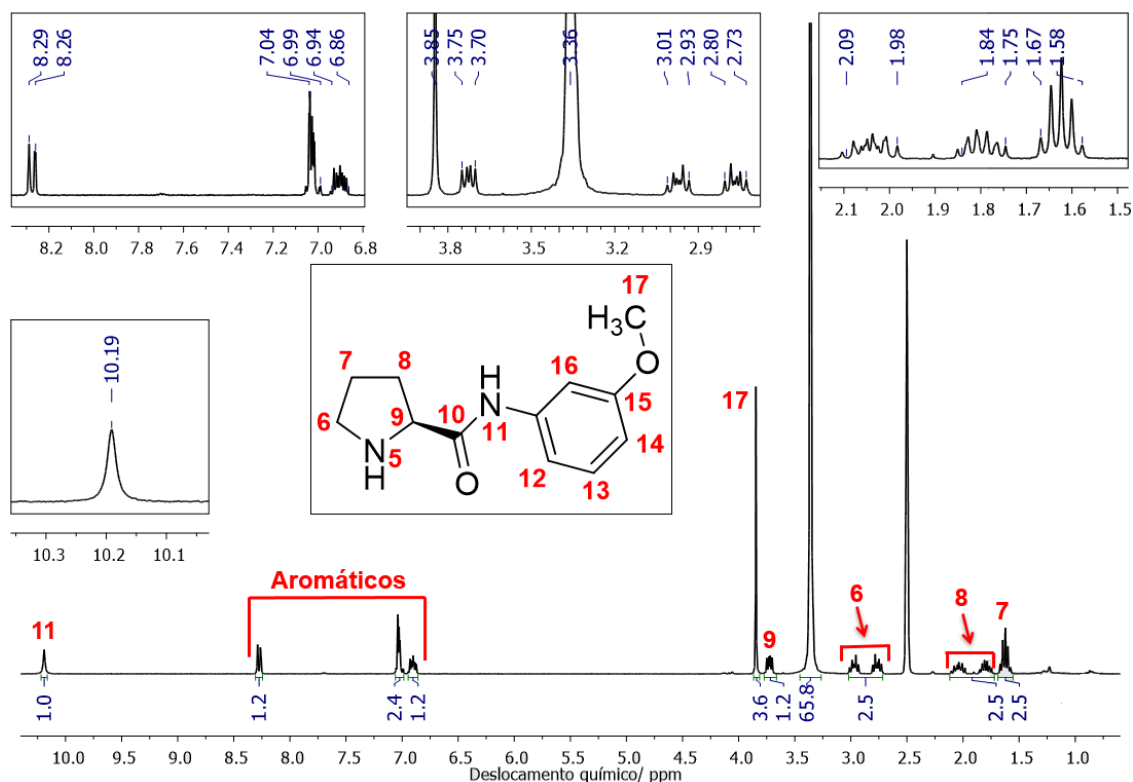


Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H do intermediário **25i** (300 MHz, DMSO-d_6).
Fonte: elaborada pela autora, 2021.

Tabela 3 – Deslocamento químico e constante de acoplamento dos hidrogênios dos intermediários sintetizados.

(continua)				
Posição/Composto	24h	24i	25h	25i
1, 2 e 3	1,50–1,41 (d, J = 27,1 Hz, 9H)	1,50–1,42 (d, J = 27,1 Hz, 9H)	–	–
5	–	–	2,88 (s, 1H)	–
6	3,69–3,24 (m, 2H)	3,69–3,33 (m, 2H)	2,90–2,86 (t, J = 6,5 Hz, 2H)	3,01–2,73 (ddt, J = 61,8, 10,3, 6,5 Hz, 2H)
7	1,93–1,63 (m, 2H)	1,93–1,65 (m, 2H)	1,68–1,59 (p, J = 6,8 Hz, 2H)	1,67–1,58 (p, J = 6,8 Hz, 2H)
8	2,48–2,24 (m, 2H)	2,47–2,23 (m, 2H)	2,09–1,71 (m, 2H)	2,09–1,84 (m, 2H)
9	4,48–4,36 (m, 1H)	4,48–4,33 (d, J = 43,8 Hz, 1H)	3,69–3,64 (dd, J = 8,8, 5,6, Hz, 1H)	3,75–3,70 (dd, J = 9,1, 5,3 Hz, 1H)
11	–	–	9,92 (s, 1H)	10,19 (s, 1H)
12	8,39–8,36 (d, J = 7,8 Hz, m 1H)	8,39–8,36 (d, J = 7,08 Hz, m 1H)	7,35–7,34 (m, 1H)	8,29–8,26 (m, 1H)

Tabela 3 – Deslocamento químico e constante de acoplamento dos hidrogênios dos intermediários sintetizados.

Posição/Composto	24h	24i	25h	(conclusão) 25i
13	7,05–6,86 (m, 3H)	7,04–6,86 (m, 3H)	7,21–7,15 (m, 2H)	7,04–6,99 (m, 2H)
14	7,05–6,86 (m, 3H)	7,04–6,86 (m, 3H)	7,21–7,15 (m, 2H)	6,94–6,86 (m, 1H)
15	7,05–6,86 (m, 3H)	–	6,65–6,60 (m, 1H)	–
16	–	7,04–6,86 (m, 3H)	–	7,04–6,99 (m, 2H)
17	3.86 (s, 3H)	3.86 (s, 3H)	3.36 (s, 3H)	3.36 (s, 3H)

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

4.5 Análise dos resultados da etapa de estudos computacionais

Após obtenção do arquivo da proteína, contendo as informações referentes à estrutura tridimensional com PDB ID 5AFH, gerou-se o gráfico de Ramachandran (**Figura 28**) para avaliação da qualidade da estrutura cristalográfica.

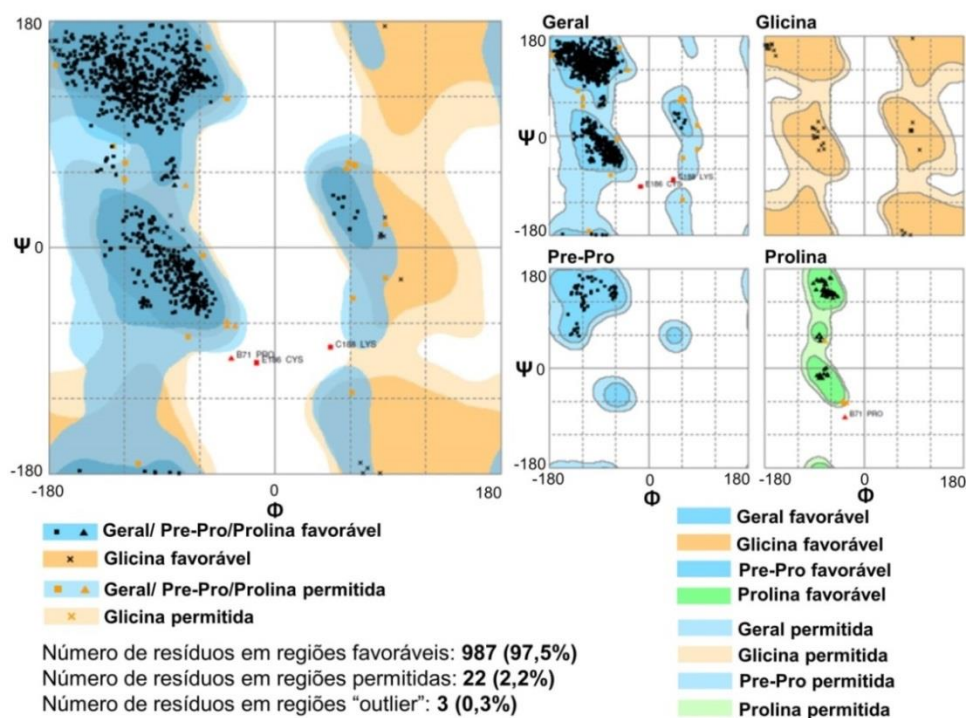
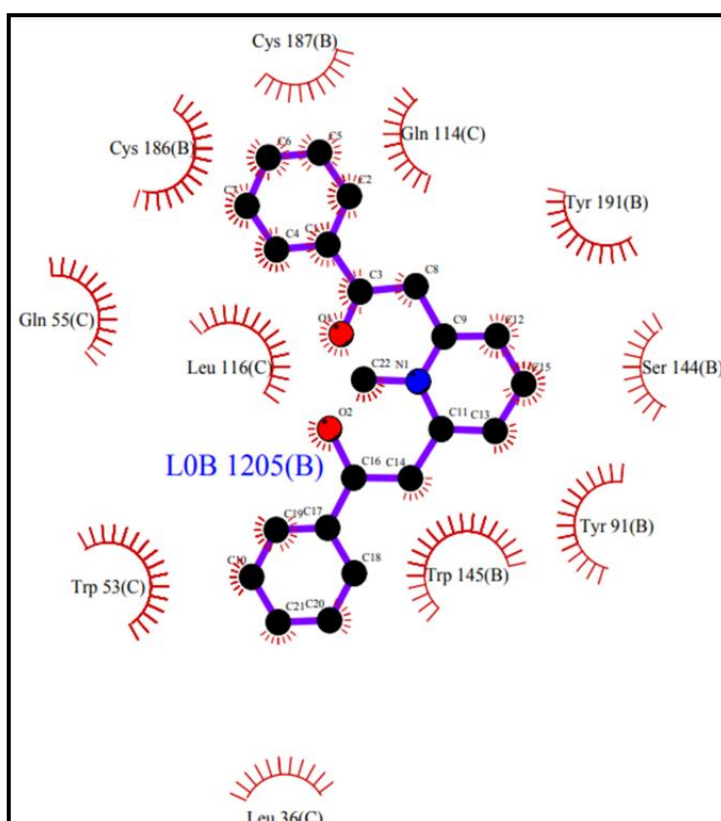


Figura 28 – Gráfico de Ramachandran, referente à estrutura cristalográfica da 5AFH, co-cristalizada com **2**.

Fonte: gerada pela autora (2021) no software RAMPAGE.

Analisando o gráfico, observa-se que ele está dentro dos padrões adequados, apresentando 97,5% (987) de resíduos em regiões permitidas e 2,2% (22) em regiões adicionalmente permitidas, indicando a presença de apenas 3 resíduos de aminoácidos nas regiões “outlier” sendo eles B = P71, C = K188 e E = C186, que não são resíduos-chave do sítio ativo e encontram-se distantes do sítio ativo utilizado neste trabalho.

Sabendo que **2** está presente no sítio ativo do receptor, foi realizada uma análise do arquivo PDBsum (**Figura 29**) com objetivo de verificar quais resíduos de aminoácidos interagem molécula nessa região. Além disso, no estudo de validação, as interações observadas para **2** co-cristalizado foram com os resíduos: B:W145 (cátion- π , hidrofóbica, empilhamento-T), B:Y184 (cátion- π , hidrofóbica), C:W53 (ligação de hidrogênio não-clássica, empilhamento-T), C:L116, B:Y191, B:C186 e B:C187 (interações do tipo hidrofóbicas para todos esses últimos). Nesse caso a letra B corresponde à subunidade que compõe o lado principal do sítio ativo e a letra C a subunidade complementar do mesmo sítio (BATISTA, 2019).



As poses ranqueadas para os dezesseis intermediários se encontram representadas nas **Figuras 30–45** todas elaboradas pela autora no programa *Pymol*. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza, e as ligações de hidrogênio estão representadas por tracejados de cor preta. Além disso, têm-se definidas as cores: vermelho para oxigênio; azul escuro para nitrogênio; azul claro para flúor e amarelo para enxofre. Os átomos de carbono dos resíduos de aminoácidos da cadeia B estão representados em verde e os mesmos átomos da cadeia C em lilás, já para os carbonos dos ligantes, estão representados em rosa.

No trabalho de cristalografia que elucidou a proteína utilizada na ancoragem molecular desta dissertação (SPURNY; *et al.* 2015), foram observadas algumas interações importantes entre **2** e o receptor. O ligante co-cristalizado adotou uma conformação semelhante a uma pinça com os dois anéis aromáticos beliscando o resíduo aromático altamente conservado do loop D (W53). Com isso, formaram-se interações intramoleculares como, por exemplo, entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio da piperidina protonada e seu próprio álcool e oxigênios carbonílicos. Dessa forma, como é relatado que a conformação de **2** foi fator importante para a ocorrência de interações com a proteína, nos resultados discutidos a seguir, mostra-se também nas figuras **30–45**, a sobreposição dos ligantes estudados com **2**.

Analizando as interações mais relevantes entre a molécula **24h** ancorada e os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo na **Figura 30**, é possível observar duas interações sigma- π . Ambas acontecem entre o átomo de carbono terc-butil do ligante com os anéis aromáticos dos resíduos Y191 (3,88 Å) e Y184 (3,47 Å). Ocorrem também duas interações do tipo empilhamento- π entre o anel aromático do ligante com os dois anéis da subunidade indola do resíduo W53 (4,01 e 4,17 Å).

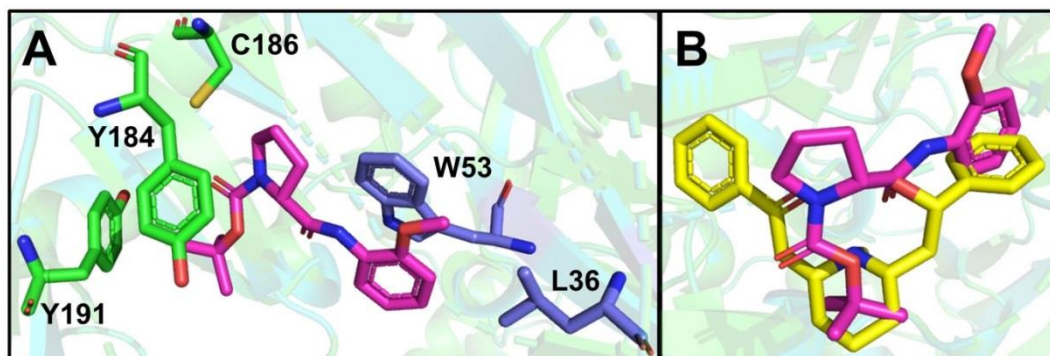


Figura 30 – **A**, pose melhor ranqueada para o ligante **24h** (átomos de C em rosa). **B**, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **24h** (átomos de C em rosa) e **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Na estrutura **25h** (**Figura 31**) ancorada, observou-se uma ligação de hidrogênio clássica acontecendo entre o átomo de oxigênio da carbonila do ligante com o hidrogênio da hidroxila do resíduo Y184 (2,72 Å). São observadas duas interações π -enxofre entre o anel aromático de **25h** com os átomos de enxofre dos resíduos C186 (4,98 Å) e C187 (5,45 Å). Além disso, visualizou-se uma interação do tipo empilhamento- π entre o anel aromático do ligante e do resíduo Y184 (3,65 Å), e uma do tipo empilhamento-T entre o anel aromático de **25h** e o anel aromático do resíduo Y191 (4,78 Å).

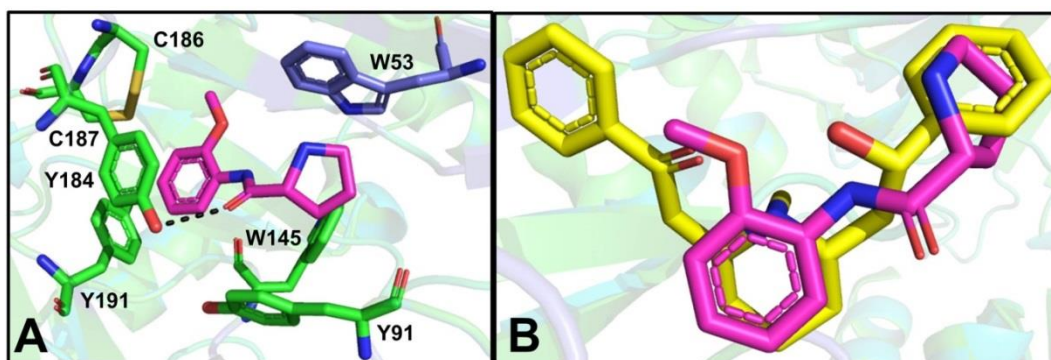


Figura 31 – **A**, pose melhor ranqueada para o ligante **25h** (átomos de C em rosa). **B**, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **25h** (átomos de C em rosa) e **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Analisando a **Figura 32** com as interações entre a molécula **24e** ancorada e os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo, notam-se três contatos do tipo sigma- π . A primeira delas acontece entre o átomo de carbono da subunidade isopropila do resíduo L106 com o anel aromático do ligante (3,93 Å). A segunda ocorre entre o átomo de carbono da subunidade isopropila do resíduo L116 com o anel aromático do ligante (3,28 Å). A terceira é observada entre o anel aromático do

resíduo W53 e o átomo de carbono da subunidade *terc*-butila de **24e** (3,71 Å). Também é uma interação do tipo empilhamento-T entre o anel aromático do ligante com o pirrol do resíduo W145 (4,96 Å).

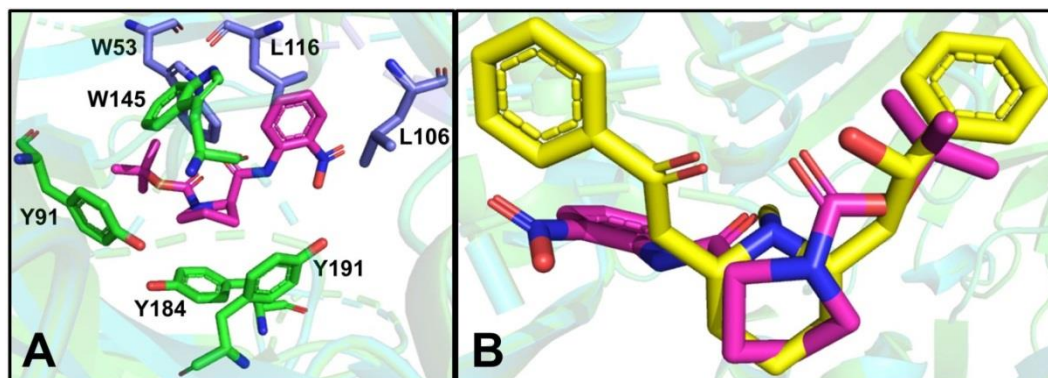


Figura 32 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **24e** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **24e** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Na estrutura **25e** (**Figura 33**) ancorada são visualizadas duas interações π -enxofre entre o anel aromático de **25e** com os átomos de enxofre dos resíduos C186 (4,24 Å) e C187 (4,82 Å). Além disso, há uma interação do tipo empilhamento- π entre o anel aromático do ligante e do resíduo Y184 (3,75 Å), assim como uma do tipo empilhamento-T entre o anel aromático de **25e** e o anel aromático do resíduo Y191 (4,94 Å). Neste caso, as interações são semelhantes às ocorridas com a molécula **25h**, diferindo apenas pela falta de ligação de hidrogênio.

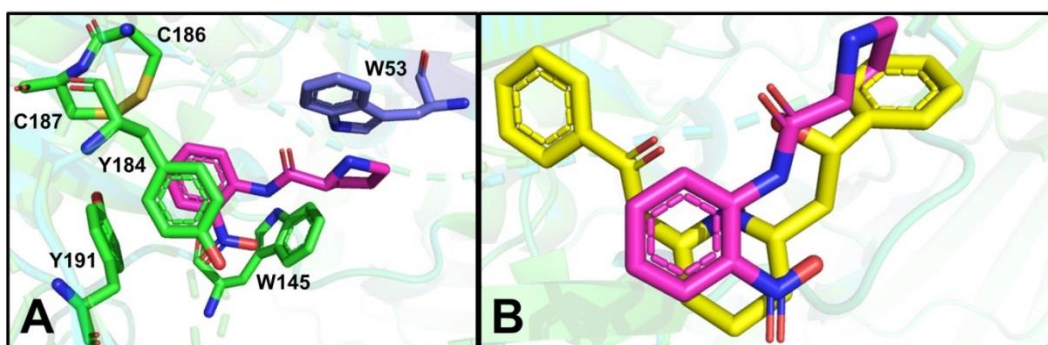


Figura 33 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **25e** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **25e** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Analisando a **Figura 34** que mostra as interações entre **24k** ancorada e os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo, constata-se uma ligação de hidrogênio clássica ocorrendo de forma intramolecular, entre um átomo de flúor da

subunidade trifluorometila com um átomo de hidrogênio amídico (1,98 Å). Visualizou-se também outra interação intramolecular de halogênio entre o mesmo átomo de flúor e o carbono da subunidade amida (3,62 Å). Além disso, há três interações do tipo sigma- π , todas ocorrendo entre carbonos da subunidade *terc*-butila de **24K** com o os anéis aromáticos dos resíduos Y91 (3,92 Å), Y191 (3,96 Å) e Y184 (3,80 Å). Por fim, observaram-se duas interações do tipo empilhamento- π entre o anel aromático de **24k** e os anéis da subunidade indola de W53 (4,33 e 4,54 Å).

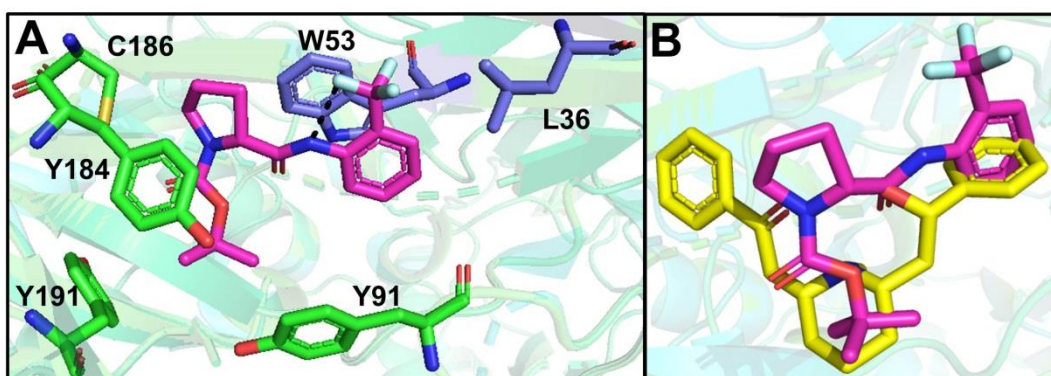


Figura 34 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **24k** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **24k** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Na estrutura **25k** ancorada (**Figura 35**), pode ser observada uma ligação sigma- π entre o centro estereogênico da subunidade pirrolidina do ligante com o anel aromático do resíduo W53 (3,56 Å). Há também uma interação empilhamento- π entre o anel aromático do ligante e do resíduo Y184 (4,62 Å), além de duas interações empilhamento-T também entre o anel aromático de **25k** com os anéis aromáticos dos resíduos Y191 (5,29 Å) e W145 (5,29 Å).

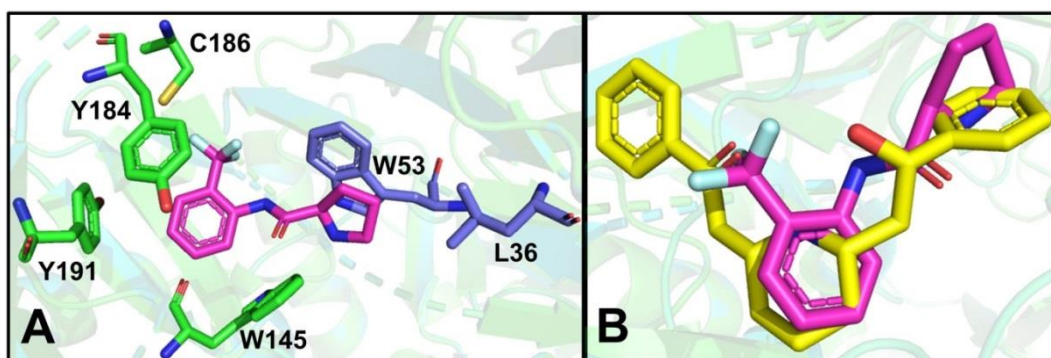


Figura 35 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **25k** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **25k** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Analisando a **Figura 36** com as interações de **24b**, observam-se três ligações de hidrogênio clássicas. A primeira ocorre entre o oxigênio carbonílico do grupo *Boc* do ligante com um átomo de hidrogênio do grupo amino do resíduo K141 (1,97 Å). A segunda entre um átomo de flúor de **24b** com o de hidrogênio da subunidade hidroxila do resíduo Y184 (2,93 Å). A terceira ocorre de forma intramolecular entre o mesmo átomo de flúor e o hidrogênio amídico do ligante (2,29 Å). Há também uma interação carbono-hidrogênio entre um dos átomos de carbono do anel pirrolidínico e o átomo de hidrogênio da hidroxila do resíduo Y91 (3,33 Å). Observa-se uma interação de halogênio entre um dos átomos de flúor do ligante com o oxigênio carbonílico do resíduo W145 (3,65 Å), e uma interação do tipo empilhamento-T entre o anel aromático de **24b** e o anel aromático de seis membros do resíduo W53 (4,90 Å).

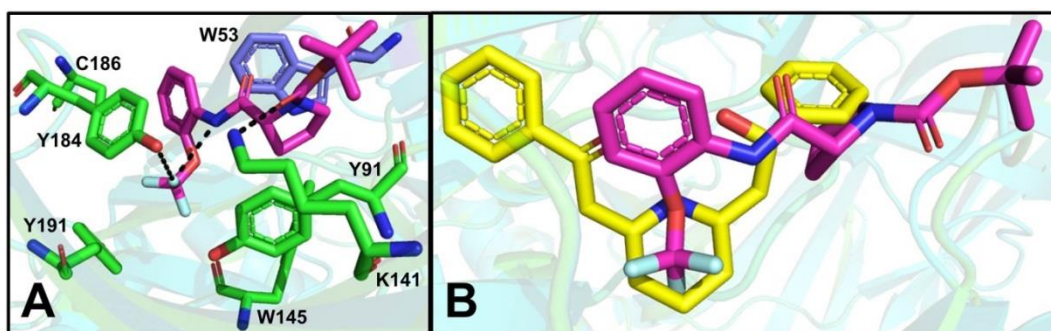


Figura 36 – **A**, pose melhor ranqueada para o ligante **24b** (átomos de C em rosa). **B**, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **24b** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Na **Figura 37** com a estrutura **25b** ancorada, são passíveis de observação duas ligações de hidrogênio, sendo ambas entre o mesmo átomo de flúor do ligante, uma intramolecular, ocorrendo com o hidrogênio amídico (2,47 Å) e a outra com o de hidrogênio da subunidade hidroxila do resíduo Y184 (2,67 Å). Visualiza-se também uma interação de halogênio entre um dos átomos de flúor de **25b** com o oxigênio carbonílico do resíduo S144 (3,69 Å) que se encontra mais distante da subunidade indola. Além disso, observou-se uma interação π -enxofre entre o anel aromático do ligante com o átomo de enxofre do resíduo C186 (4,75 Å) e uma do tipo empilhamento- π entre os anéis aromáticos do ligante e do resíduo Y184 (4,11 Å).

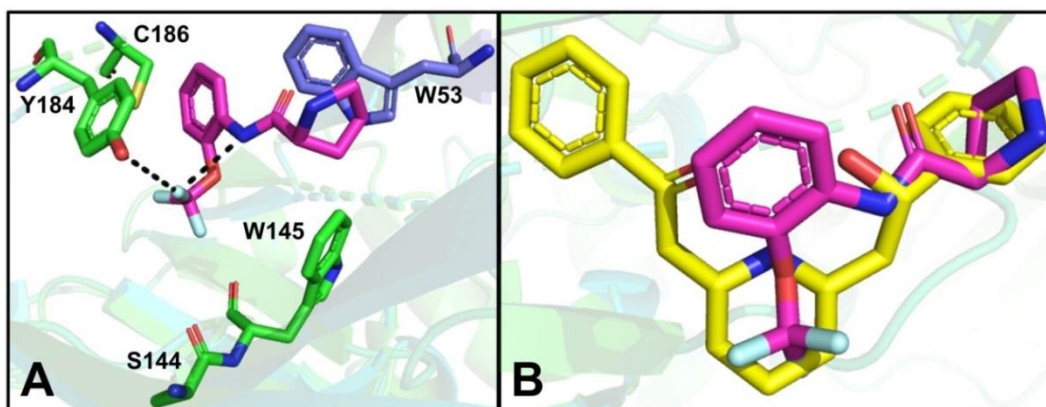


Figura 37 – **A**, pose melhor ranqueada para o ligante **25b** (átomos de C em rosa). **B**, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **25b** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Analisando as interações mais relevantes entre a molécula **24i** ancorada (**Figura 38**) e os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo observa-se uma ligação de hidrogênio não clássica do tipo hidrogênio- π entre o hidrogênio amídico de **24i** e o anel aromático do resíduo Y184 (2,82 Å). Há também uma interação carbono-hidrogênio entre o átomo de carbono da subunidade metoxila e o átomo de hidrogênio de uma das hidroxilas do resíduo E185 (3,34 Å). Visualiza-se também uma interação Π -enxofre entre o anel aromático do ligante com o átomo de enxofre do resíduo C186 (3,70 Å) e uma do tipo empilhamento-T entre os anéis aromáticos do ligante e do resíduo W53 (4,71 Å).

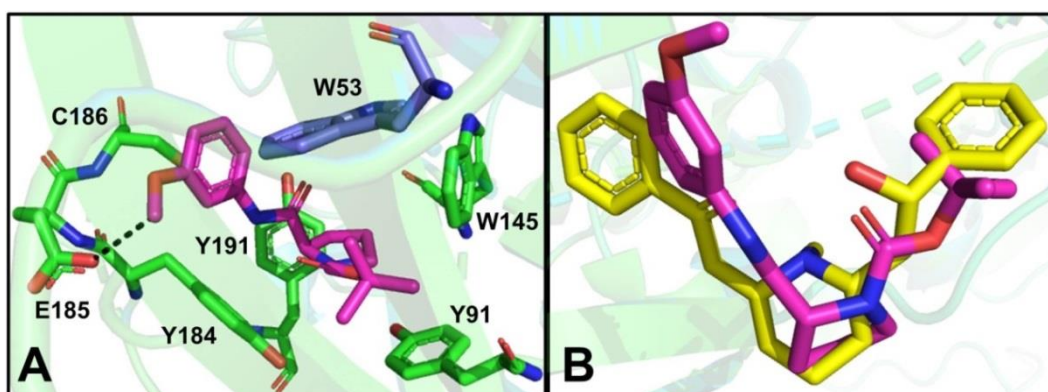


Figura 38 – **A**, pose melhor ranqueada para o ligante **24i** (átomos de C em rosa). **B**, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **24i** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Analisando as interações de **25i** ancorada (**Figura 39**) foram observadas três ligações de hidrogênio clássicas, sendo a primeira entre o átomo de oxigênio da carbonila do ligante com o hidrogênio da subunidade hidroxila do resíduo Y191 (2,80 Å). A segunda e terceira ocorrem entre o mesmo átomo de oxigênio da carbonila do

resíduo W145 com o átomo de hidrogênio da subunidade amídica (2,20 Å) e um dos hidrogênios ligados ao nitrogênio do anel pirrolidínico (1,81 Å), ambos de **25i**. Há também a presença de duas interações do tipo empilhamento-T. Todas ocorrem entre o anel aromático do ligante com os anéis aromáticos dos resíduos Y184 (4,68 Å) e Y191 (4,91 Å).

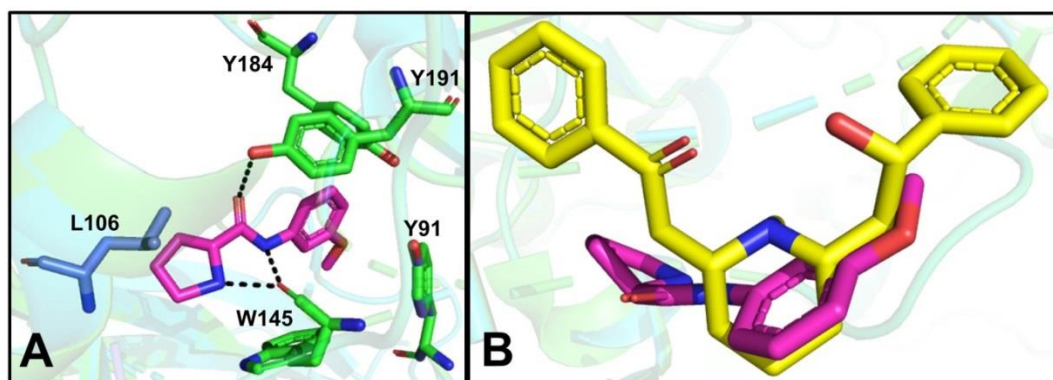


Figura 39 – **A**, pose melhor ranqueada para o ligante **25i** (átomos de C em rosa). **B**, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **25i** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Na **Figura 40** com a estrutura **24f** ancorada foram notadas duas ligações de hidrogênio, sendo uma clássica intramolecular entre o átomo de hidrogênio amídico e o oxigênio do grupo *Boc* (1,62 Å). A segunda é uma ligação de hidrogênio- π entre o hidrogênio do grupo nitro de **24f** e o anel aromático do resíduo W53 (3,27 Å). Visualizam-se também três interações do tipo sigma- π , sendo duas delas entre o mesmo carbono da subunidade *terc*-butila do grupo *Boc* do ligante com os anéis aromáticos dos resíduos Y184 (3,85 Å) e Y191 (3,63 Å). Já a terceira entre o anel aromático do resíduo Y184 e o outro carbono da mesma subunidade do ligante (3,66 Å). Por fim, há quatro interações empilhamento-T entre o anel aromático de **24f** e os anéis aromáticos dos resíduos Y91 (5,15 Å), W145 (5,09 Å) e W53 (5,19 e 5,05 Å).

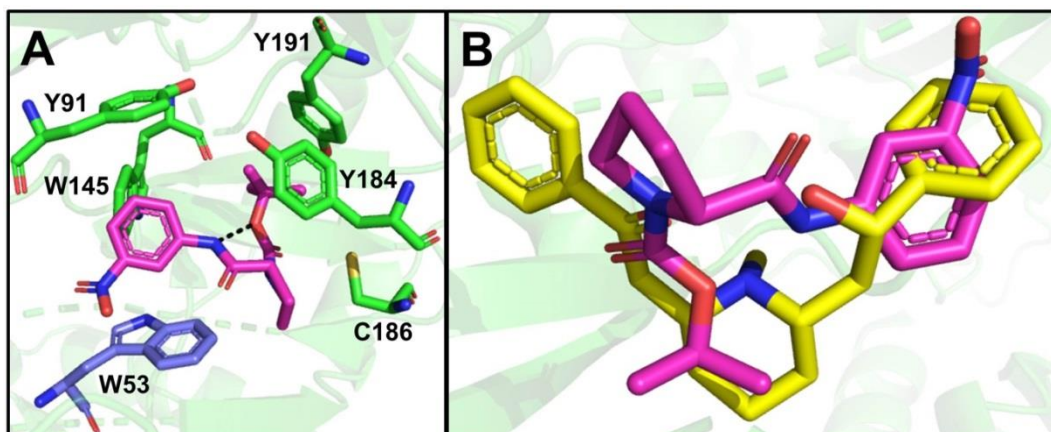


Figura 40 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **24f** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **24f** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Analisando as interações mais relevantes entre a molécula **25f** ancorada (**Figura 41**) e os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo, percebem-se duas ligações de hidrogênio. A primeira entre um átomo de hidrogênio da subunidade *terc*-butila do grupo *Boc* do ligante com o oxigênio carbonílico do resíduo W145 (2,04 Å). A segunda ocorre entre o hidrogênio do grupo nitro de **25f** com o oxigênio também carbonílico do resíduo Y91 (2,67 Å). Há também três interações do tipo empilhamento-T entre o anel aromático do ligante com os anéis aromáticos dos resíduos Y91 (5,21 Å), W53 (5,17 e 4,93 Å).

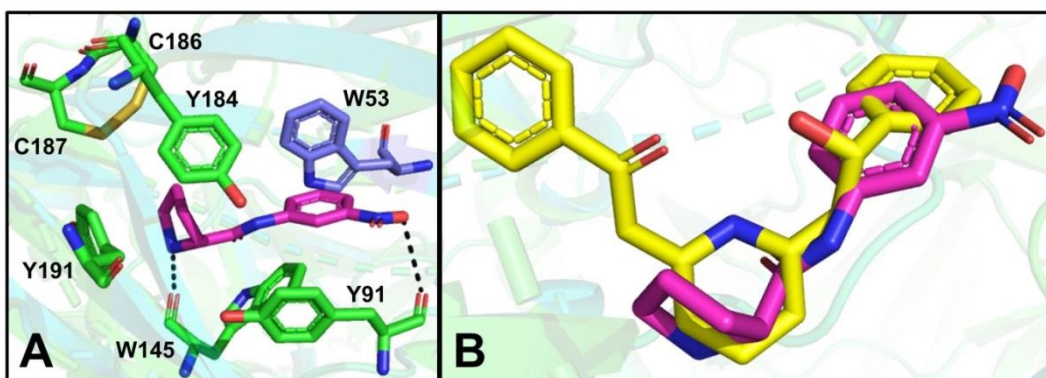


Figura 41 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **25f** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **25f** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Na estrutura **24l** ancorada (**Figura 42**) foram observadas duas interações do tipo empilhamento-T entre o anel aromático do ligante e os anéis dos resíduos W145 (4,83 Å) e Y191 (5,53 Å). Além de uma interação empilhamento- π entre o anel aromático do ligante e o anel aromático do resíduo Y184 (5,05 Å).

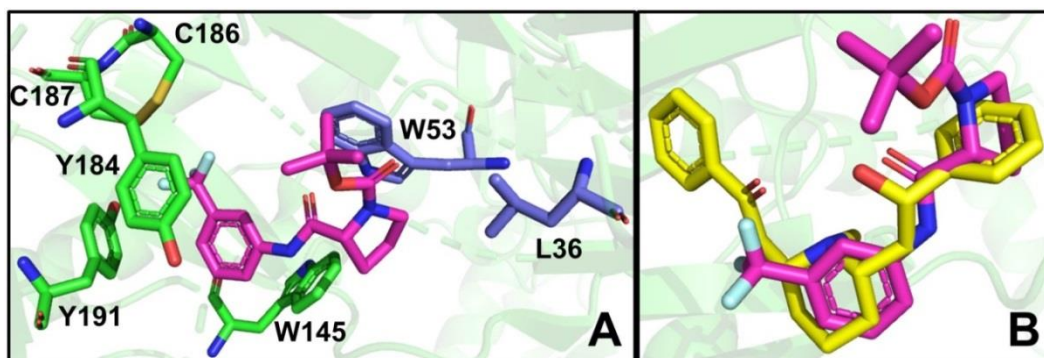


Figura 42 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **24I** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **24I** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Na estrutura **25I** ancorada (**Figura 43**) foram observadas três ligações de hidrogênio clássicas, sendo a primeira entre o átomo de oxigênio da carbonila do ligante com o hidrogênio da subunidade hidroxila do resíduo Y191 (2,65 Å). A segunda e a terceira ocorrem entre o mesmo átomo de oxigênio da carbonila do resíduo W145 com o átomo de hidrogênio da subunidade amídica (2,20 Å) e um dos hidrogênios ligados ao nitrogênio do anel pirrolidínico (1,92 Å), ambos de **25I**. Há também uma interação carbono-hidrogênio entre um dos átomos de carbono do anel pirrolidínico e o átomo de hidrogênio da hidroxila do resíduo L104 (3,79 Å). Além disso, notam-se a presença de três interações do tipo empilhamento- π . Todas ocorrem entre o anel aromático do ligante com os anéis aromáticos dos resíduos Y184 (4,60 Å), Y191 (4,60 Å) e W145 (5,73 Å).

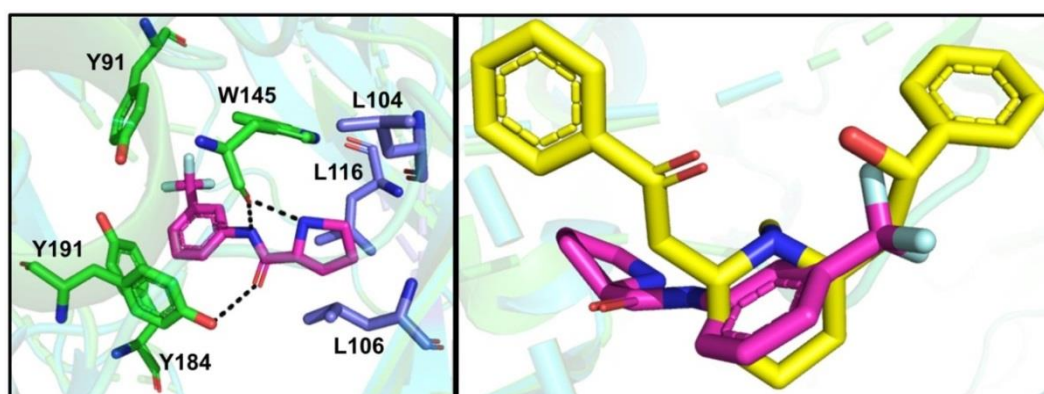


Figura 43 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **25I** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **25I** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Analisando as interações mais relevantes entre a molécula **24m** ancorada (**Figura 44**) e os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo pode ser notada

uma interação de halogênio entre um dos átomos de flúor do ligante com o oxigênio carbonílico do resíduo W145 (3,57 Å). Além disso, visualiza-se também uma interação do tipo empilhamento- π entre o anel aromático de **24m** e o anel aromático de seis membros do resíduo Y184 (4,58 Å).

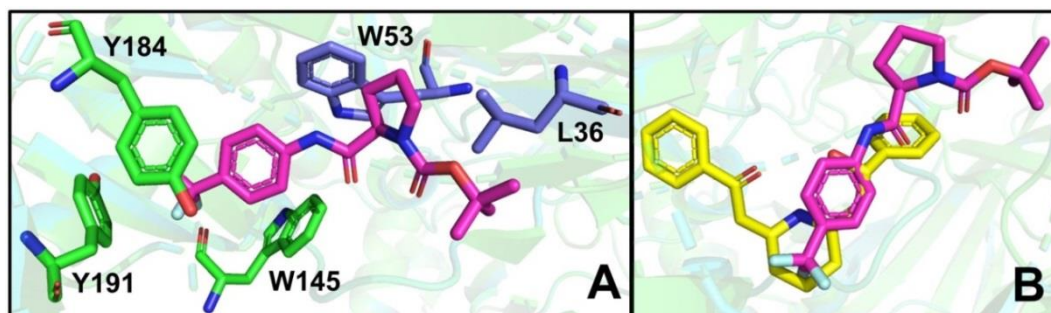


Figura 44 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **24m** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **24m** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Na estrutura **25m** ancorada (**Figura 45**), duas ligações de hidrogênio são observadas: uma clássica, que ocorre entre um dos hidrogênios ligados ao nitrogênio do anel pirrolidínico do ligante com o átomo de oxigênio carbonílico do resíduo W145 (2,09 Å), e uma não-clássica do tipo hidrogênio- π , entre um dos hidrogênios ligados ao nitrogênio do anel pirrolidínico de **25m** e o anel aromático do resíduo Y191 (2,96 Å). Há também uma interação de halogênio entre um dos átomos de flúor do ligante com o oxigênio carbonílico do resíduo Y91 (3,55 Å). Por fim três interações do tipo empilhamento-T entre o anel aromático de **5** e os anéis aromáticos dos resíduos Y91 (4,97 Å) e W53 (5,19 e 5,10 Å).

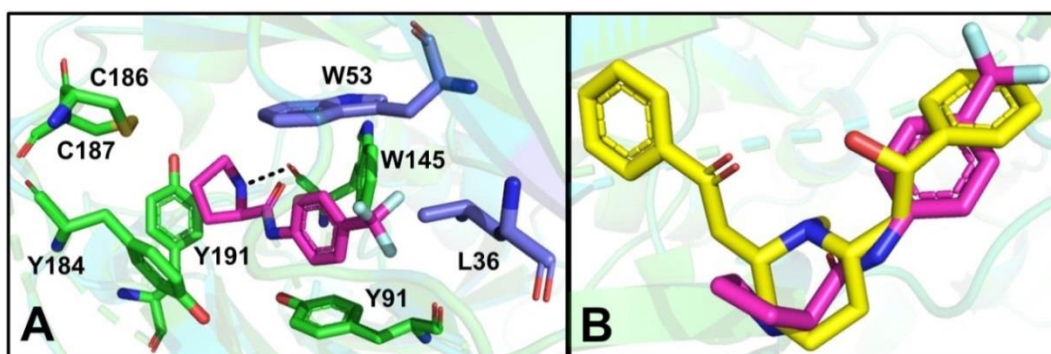


Figura 45 – A, pose melhor ranqueada para o ligante **25m** (átomos de C em rosa). B, sobreposição dos átomos entre a pose com maior pontuação para o ligante **25m** (átomos de C em rosa) e a **2** co-cristalizada (átomos de C em amarelo).

Observando-se os dados mostrados no **Quadro 1**, é possível constatar que todas as moléculas testadas interagem com os resíduos de interesse e a maioria também interage com outros resíduos que estão próximos à **2** co-cristalizada, segundo a **Figura 29**. Analisando ainda o mesmo quadro, têm-se sete fragmentos que realizam ligação de hidrogênio sendo que dois deles (**25i** com substituinte em *meta* metoxila e **25l** com substituinte em *meta* trifluorometila, ambos sem a presença de grupo *Boc*) mostram três ligações desse tipo, todas com resíduos de interesse. Desses sete, apenas dois fazem esse tipo de interação também com resíduos que não são considerados chave, de acordo com a reancoragem.

Quadro 1 – Interações observadas para os 16 fragmentos intermediários de reação. Resíduos em vermelho são ilustrados como os de interesse.

Lig.	W53	W145	Y184	Y191	C186	C187	Y91	L36	K141	S144	E185	L116
24h												
25h												
24e												
25e												
24k												
25k												
24b												
25b												
24i												
25i												
24f												
25f												
24l												
25l												
24m												
25m												

L E G E N D A	Empilhamento- π		Sigma- π		π -enxofre		
	Empilhamento-T		Alquil		Ligação de hidrogênio clássica		Não Favorável
	π -alquil		halogênio		Ligação de hidrogênio não-clássica		

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

Na **Tabela 4** é possível observar a quantidade total de interações dos ligantes com a proteína e a quantidade de interações com os resíduos de interesse, além do *Score* de cada molécula (melhor pontuação resultante da ancoragem molecular). As estruturas foram organizadas da melhor para a pior, de cima para baixo. Os critérios seguidos na classificação foram: maior quantidade de interações com resíduos-chave (segundo reancoragem); maior semelhança de interações em comparação com **2** co-cristalizada; maior pontuação (*PLP Score* = melhor conformação do ligante); e presença de interação não favorável com resíduos-chaves.

Tabela 4 – Ligantes ordenados do melhor para o pior (de cima para baixo), melhor pontuação obtida por ancoragem molecular e W, além da quantidade de interações.

Ligante	PLP Score	W	Interações com resíduos-chave	Total interações
24f	62,08	<i>m</i> -NO ₂	11	12
24k	67,49	<i>o</i> -CF ₃	10	13
25m	65,24	<i>p</i> -CF ₃	10	13
24l	65,40	<i>m</i> -CF ₃	9	10
25l	61,71	<i>m</i> -CF ₃	9	12
25k	55,00	<i>o</i> -CF ₃	9	10
24h	61,89	<i>o</i> -OCH ₃	8	10
25h	50,46	<i>o</i> -OCH ₃	8	9
24b	76,42	<i>o</i> -OCF ₃	7	10
25b	56,58	<i>o</i> -OCF ₃	7	8
25i	53,12	<i>m</i> -OCH ₃	7	9
25f	52,61	<i>m</i> -NO ₂	7	9
24i	59,81	<i>m</i> -OCH ₃	6	9
24m	63,90	<i>p</i> -CF ₃	5	7
24e	60,30	<i>o</i> -NO ₂	7	8
25e	50,61	<i>o</i> -NO ₂	7	7

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

Apesar dessa ordem de prioridades estabelecida para o ranqueamento acima disposto, tem-se a pontuação *PLP Score*, como um item de importância que também pode ser utilizado como critério principal na definição da ordem do melhor para o pior ligante.

Na ancoragem molecular a predição das interações ligante-receptor ocorrem em duas etapas correlacionadas, sendo a primeira uma amostragem das conformações do ligante dentro do sítio ativo e a segunda, um ranqueamento das mesmas através de uma ou mais funções de pontuação, que estima a energia de ligação do complexo ligante-proteína (MENG; *et al.* 2011; SALMASO; MORO, 2018). Essa etapa de amostragem, da idealidade, deve conseguir buscar de forma eficiente as conformações dentro do espaço conformacional do ligante que se encaifrem ao perfil da superfície de energia livre do alvo. Já a função de pontuação tem como objetivo associar corretamente as poses melhor ranqueadas com os modos de ligação descritos experimentalmente para um par ligante-proteína, e com a preservação das interações com resíduos de interesse (MENG; *et al.* 2011; FERREIRA; *et al.* 2015). Dessa forma, tem-se a importância desse fator de pontuação que pode, também ser o principal ponto analisado em um ranqueamento de ligantes.

Analisando as estruturas seguindo a ordem estabelecida na **Tabela 4**, os ligante com substituintes na posição *orto*, do anel, têm-se as colocações 2^a (*o*-CF₃ com *Boc*), 6^a (*o*-CF₃ sem *Boc*), 7^a (*o*-OCH₃ com *Boc*), 8^a (*o*-OCH₃ sem *Boc*), 9^a (*o*-OCF₃ com *Boc*), 10^a (*o*-OCF₃ sem *Boc*), 15^a (*o*-NO₂ com *Boc*) e 16^a (*o*-NO₂ sem *Boc*), considerando-se a ordem crescente da melhor para a pior. Pode-se concluir, portanto, que não é uma posição essencial para ocorrência de mais interações, já que não houve um padrão entre as primeiras colocadas. As moléculas com substituinte em *orto* no anel aromático ocuparam posições aleatórias, sendo esse outro ponto de reforço que apenas a posição do substituinte em *orto* não é suficiente para definir quantidade e qualidade de interações.

Para substituintes em *meta*, observaram-se as colocações 1^a (*m*-NO₂ com *Boc*), 4^a (*m*-CF₃ com *Boc*), 5^a (*m*-CF₃ sem *Boc*), 11^a (*m*-OCH₃ sem *Boc*), 12^a (*m*-NO₂ sem *Boc*) e 13^a (*m*-OCH₃ com *Boc*). Portanto, a molécula melhor classificada possui substituinte nessa posição seguida pela 4^a e 5^a colocadas. Porém, ainda sim, fica clara a importância do tipo de substituinte e não apenas a sua posição para essa classificação, considerando que também há moléculas com substituintes em *meta*

dentre as seis piores colocações (11^a, 12^a e 13^a), portanto posições aleatórias como no caso anterior.

Na posição *para*, foram analisadas apenas duas estruturas que ocuparam posições 3^a (*p*-CF₃ sem *Boc*) e 14^a (*p*-CF₃ com *Boc*), sendo extremos opostos no *ranking*. Como nesse caso o substituinte do anel aromático é o mesmo (trifluorometil), o fator determinante foi a presença ou não do grupo *Boc*.

Pautando-se o grupo substituinte, observam-se os fluorados nas classificações 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 9^a, 10^a e 14^a. Com isso, e analisando as interações que o átomo de flúor realiza, é evidente que esses substituintes auxiliam no aumento do número de interações com os resíduos-chave de aminoácidos da proteína juntamente combinados às posições no anel. As estruturas com substituintes *orto*-trifluorometoxiladas com classificações 9^a e 10^a seguidas da *para*-metilfluorada 14^a se mostram as piores dentre os substituintes fluorados. Têm-se, portanto, uma não eficiência para interações do átomo de oxigênio nas trifluorometoxiladas em *orto* e o mesmo para presença do grupo *Boc* no caso da *para*-metilfluorada, dado que a estrutura **25m** sem o grupo protetor ocupa uma ótima colocação, mostrando que nesse caso essa diferença interfere significativamente.

Considerando os tipos de ligações ou interações previstas nos estudos de ancoragem molecular, sabe-se que ligações de hidrogênio clássicas são fortes e por isso ligantes que realizam esse tipo de ligação podem ter mais afinidade pela proteína (SANTOS; REGO; OLIVEIRA, 2014). No caso, as moléculas com ligações de hidrogênio são: **25h**, **24b**, **25b**, **25i**, **25f**, **25l** e **25m**. Dessas, apenas três estão entre as oito melhores colocadas e quatro entre as oito piores colocadas. Portanto, neste trabalho não se pode atrelar diretamente o fato de realizar ligação de hidrogênio como algo essencial para a qualidade das moléculas.

Durante a classificação, uma exceção ocorreu com **24e** e **25e**, que ficaram em última colocação, pelo fato de apresentarem uma interação desfavorável. Ambas são moléculas nitradas, com substituinte nitro localizado em posição *orto*, tendo como diferença apenas a presença ou não do grupo protetor *Boc*. Dessa forma, e neste caso, o grupo protetor não interferiu o bastante para evitar essa interação desfavorável. Particularmente ambas as interações desfavoráveis ocorrem entre “O” do grupo nitro: uma com hidrogênio do resíduo Y191 (**24e** 2,11 Å) e outra com Y91 (**25e** 2,84 Å).

Observa-se, ainda, que a molécula melhor colocada foi **24f**, também com substituinte nitrado, porém em *meta*, e com grupo protetor *Boc*. Já a mesma sem o grupo protetor se apresenta em 12^a posição. Dessa forma, comparando-se as duas, conclui-se que a presença de *Boc* foi importante para a qualidade do ligante. Ainda, dentre as oito estruturas com o grupo protetor, em sete casos esse grupo faz interações com resíduos, sendo que cinco envolvendo resíduos-chave. Abaixo, no **Quadro 2**, apresentam-se a relação de interações e resíduos apenas do grupo *Boc*.

Quadro 2 – Interações observadas para o grupo protetor *Boc* dos oito fragmentos intermediários de reação. Resíduos destacados em vermelho são os de interesse.

Ligante	W53	W145	Y184	Y191	C186	Y91	L36	K141
24h								
24e								
24k								
24b								
24i								
24f								
24l								
24m								

Legenda			
Ligação de hidrogênio clássica		Sigma- π	
π -alquil		Alquil	

Fonte: elaborada pela autora, 2021.

Como se pode observar, há diversas interações do grupo protetor com resíduos de interesse, podendo esse ser considerado importante, em conjunto com o tipo de substituinte para a ocorrência de interações, principalmente a subunidade terc-butila e os átomos de oxigênio. Comparando-se as estruturas com o mesmo substituinte do anel aromático e na mesma posição, diferindo apenas da presença ou não do *Boc*, têm-se oito pares de substâncias. Dessas, seis pares tem a estrutura com o grupo protetor ocupando melhor colocação do que a respectiva sem o *Boc*. Isso sugere novamente a relevância desse fragmento estrutural para a relação de quantidade de interações com os resíduos-chaves.

Todavia, não é possível criar um padrão, já que entre as oito primeiras colocadas e as oito últimas colocadas há igualmente quatro moléculas com *Boc* e quatro sem. Dessa forma a combinação dos fatores é o que provavelmente gera os melhores e piores resultados.

Analisando as estruturas que não possuem o grupo protetor *Boc*, foi possível observar que apenas as com substituinte em posição *meta* e *para* tiveram interação entre os átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio do anel pirrolidínico e algum resíduo de aminoácido. Portanto quatro moléculas, sendo elas **25i**, **25l**, **25m** e **25f** (**Figura 46**), todas fazendo ligação de hidrogênio com o resíduo-chave W145.

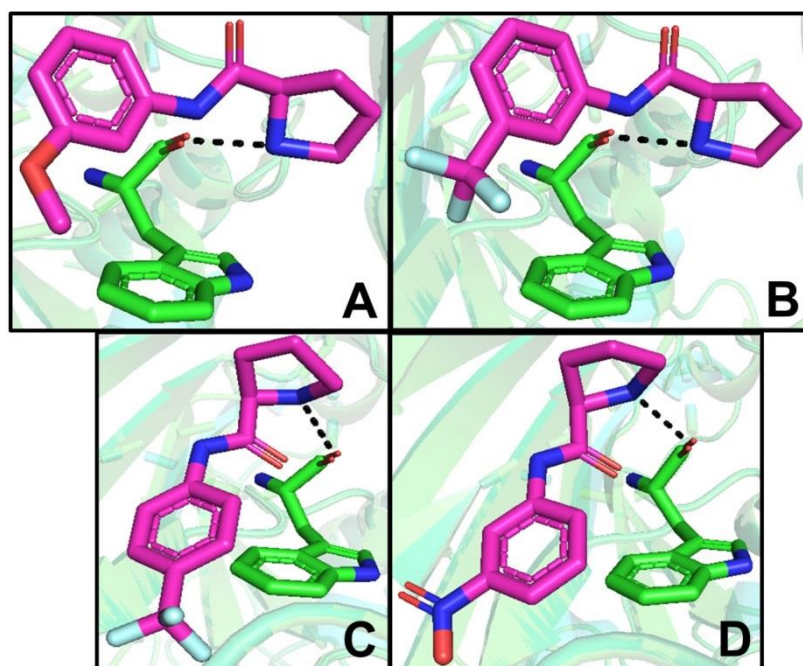


Figura 46 – Ligações de hidrogênio (linha tracejada em preto) entre os ligantes **A: 25i**; **B: 25l**; **C: 25m**; **D: 25f** (átomos de carbono em rosa) com o resíduo de aminoácido W53 (átomos de carbono em verde).

Fonte: elaborada pela autora (2021) no programa *Pymol*.

Em relação ao grupo substituinte ser doador (OCH_3) ou retirador (OCF_3 , CF_3 , NO_2) de densidade eletrônica do anel, em todos os casos foi possível observar interações do tipo empilhamento- π e/ou empilhamento-T. Dessa forma essa característica do substituinte não interfere a ponto de impedir interações desse tipo entre os anéis aromáticos envolvidos. Algo interessante observado na análise dos resultados é que a melhor molécula (**24f** *o*- NO_2 com *Boc*) é a única em que o anel aromático faz quatro interações, sendo todas empilhamento-T

5 CONCLUSÃO

Através de trabalho prévio do grupo de pesquisa, se obteve as oito melhores estruturas para a etapa de síntese, definindo-se uma rota sintética para os oito fragmentos que diferem apenas pelo grupo substituinte do anel aromático. Foram sintetizados, isolados e caracterizados quatro intermediários.

Paralelamente, visando explorar as potencialidades dos intermediários de síntese, um estudo computacional das 16 moléculas intermediárias foi desenvolvido. Dessas, quatro foram de fato sintetizadas e caracterizadas por RMN de ^1H . Na ancoragem molecular, o resíduo Y184 aparenta ser o de maior importância por interagir com todos os ligantes usados além de **2**. A investigação computacional proporcionou classificar todas as estruturas em função da quantidade de interações com os resíduos-chaves. A presença do grupo protetor *Boc*, particularmente, mostrou-se bastante interessante para a realização de interações, principalmente pela sua subunidade *terc*-butila e os dois átomos de oxigênio. Contudo, não há um padrão que permite afirmar que, pontualmente, algum fragmento molecular ou posição de substituinte, entre outros fatores, possa exercer, isoladamente, a diferença para que haja ou não interações relevantes, mas sim, um conjunto de fatores concomitantes. A melhor colocada, dentro de todos os quesitos aqui levantados computacionalmente, foi a estrutura **24f** (contendo o grupo “nitro” substituinte na posição “*meta*”), enquanto as duas piores substâncias apresentaram interação não favorável com os resíduos Y191 e Y91.

As quatro moléculas, então, que tiveram suas estruturas propostas a partir da caracterização em solução, por RMN, serão conduzidas oportunamente para outras análises e a testes farmacológicos. O mesmo pretende ser feito com as outras doze intermediárias e os oito produtos finais, em projetos a serem continuados pelo grupo no futuro. Além disso, durante o período do projeto foi escrito um artigo de Revisão sobre a atividade de substâncias oriundas de produtos naturais e de origem sintética no contexto da Doença de Alzheimer, cuja comprovação de submissão encontra-se em anexo.

Como perspectivas diante do exposto, caberia realizar a síntese completa das 8 estruturas planejadas inicialmente tentando diferentes metodologias de redução da amida, além da obtenção dos 12 intermediários restantes, e caracterização mais completo utilizando RMN, IV e dentre outras técnicas. Após isso a realização de

testes farmacológicos com as moléculas e ampliação dos estudos computacionais utilizando a proteína elucidada recentemente do receptor alvo desta pesquisa, o que possibilitaria resultados mais próximos do real.

REFERÊNCIAS

- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. **The global voice of dementia 2020, from plan to impact III**: maintaining dementia as a priority in unprecedented times. London: ADI, 2020. 82 p. Disponível em: <https://www.alzint.org/u/from-plan-to-impact-2020.pdf>. Acesso em: 17 maio 2021.
- ANDRICOPULO, A.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 771-790, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. **A cada três segundos, um idoso desenvolve algum tipo de demência no mundo**. 2018. Disponível em: <http://abraz.org.br/web/2018/08/31/a-cada-tres-segundos-um-idoso-desenvolve-algum-tipo-de-demencia-no-mundo/>. Acesso em: 20 mar. 2020.
- ATZORI, M.; OSCOS, F. G.; ARIAS, H. R. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor mediated anti-inflammatory actions modulate brain functions. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2016.
- AYLLÓN, M. S. G.; SMALL, D. H.; AVILA, J.; VALERO, J. S. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with P-Tau and β -amyloid. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, p. 1–9, 2011.
- BATISTA, V. S. **Estudos computacionais de ligantes dos receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$** . 2019. 143 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2019.
- BATISTA, V. S.; NASCIMENTO–JÚNIOR, N. M. Receptores nicotínicos de acetilcolina dos subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$: características, participação em processos patogênicos e compostos bioativos. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p.1721–1739, 2016.
- BRIGGS, C. A.; MCKENNA, D. G. Activation and Inhibition of the Human Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor by Agonists. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 1095–1102, 1998.
- CANNON, J. G. The cholinergic system. *In*: CANNON, J. G. **Pharmacology for chemists**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. Chap. 8, p. 131–149.
- CESTARI, J. A. F. **Comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer: prevalência de infecção bucal e níveis séricos de parâmetros inflamatórios**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- CUMMINGS, J. I.; ISAACSON, R. S.; SCHMITT, F. A.; VELTING, D. M. A practical algorithm for managing Alzheimer's disease: what, when, and why? **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 2, n. 3, p. 307–323, 2015.

DASH, J.; CHAKRABORTI, G.; PALADHI, S.; MANDAL, T. "On water" promoted Ullmann-type C–N bond-forming reactions: application to carbazole alkaloids by selective N-arylation of aminophenols. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 83, p. 7347–7359, 2018.

DE RUYCK, J.; BRYLSBAERT, G.; BLOSSEY, R.; LENSINK, M. F. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 9, p. 1-11, 2016.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20-33, 2016.

DUBAL, D. B.; ROGINE, C. Apolipoprotein E ϵ 4 and risk factors for Alzheimer disease – let's talk about sex. **JAMA Neurology**, v. 74, n. 10, p. 1167–1168, 2017.

ETEGHAD, S.; MAHMOUDI, J.; BABRI, S.; TALEBI, M. Effect of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor activation on beta-amyloid induced recognition memory impairment. Possible role of neurovascular function. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 30, n. 11, p. 736- 742, Nov. 2015.

FANG, R.; YE, S.; HUANGFU, J.; CALIMAG, D. P. Music therapy is a potential intervention for cognition of Alzheimer's disease: a mini-review. **Translational Neurodegeneration**, v. 6, n. 2, p. 1–8, 2017.

FERREIRA, L. G.; SANTOS, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, p. 13384-13421, 2015.

GOTTI, C.; BALESTRA, B.; MORETTI, M.; ROVATI, G. E.; MAGGI, L.; ROSSONI, G.; BERTI, F.; VILLA, L.; PALLAVICINI, M.; CLEMENTI, F. 4-Oxystilbene compounds are selective ligands for neuronal nicotinic α 7-Bungarotoxin receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 1197–1206, 1998.

HALL, J. R.; WIECHMANN, A. R.; CUNNINGHAM, R. L.; JOHNSON, L. A.; EDWARDS, M.; BARBER, R. C.; SING, M.; WINTER, S.; O'BRYANT, S. E. Total testosterone and neuropsychiatric symptoms in elderly men with Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2015.

HERNANDEZ, G. A. C.; STOKES, C.; DUGGAN, B. M.; KACZANOWSKA, K.; ARAIZA, S. B.; DOAN, L.; PAPKE, R. L.; TAYLOR, P. Synthesis, pharmacological characterization, and structure–activity relationships of noncanonical selective agonists for α 7 nAChRs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 10376–10390, 2019.

HIPPIUS, H.; NEUNDÖFER, M. D. G. The discovery of Alzheimer's disease. **Clinical Research**, v. 5, n. 1, p. 101–108, 2003.

HOJAHMAT, M.; HORTON, D. B.; NORRHOLM, S. D.; MILLER, D. K.; GRINEVICH, V. P.; DEACIUC, A. G.; DWOSKIN, L. P.; CROOKS, P. A. Lobeline esters as novel ligands for neuronal nicotinic acetylcholine receptors and neurotransmitter transporters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 640–649, 2010.

IMMING, P. Chapter 1 - **Medicinal Chemistry**: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems. in (eds. Wermuth, C. G. *et al.*) 3–13, 2016.

KNIGHT, B. J.; STACHE, E. E.; FERREIRA, E. M. Complementary stereochemical outcomes in proline-based self-regenerations of stereocenters. **Organic Letters**, v. 16, p. 432–435, 2014.

KORB, O; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modelling**, v. 49, n. 1, p. 84-96, 2009.

KOROLEV, I. O. Alzheimer's disease: a clinical and basic science review. **Medicinal Student Research Journal**, v. 4, p. 24–33, 2015.

LAGOUMINTZIS, G.; CHASAPIS, C. T.; ALEXANDRIS, N.; KOURETAS, D.; TZARTOS, S.; ELIOPOULOS, E.; FARSALINOS, K.; POULAS, K. Nicotinic cholinergic system and COVID-19: in silico identification of interactions between $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and the cryptic epitopes of SARS-Co-V and SARS-CoV-2 Spike glycoproteins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 149, p. 1–13, 2021.

LAVECCHIA, A.; GIOVANNI, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2839-2860, 2013.

LI, J.; YAO, J.; HE, W.; YANG, F.; LIU, X. Modular synthesis of new bicyclic carbene precursors. **Letters in organic Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 951–954, 2019.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23–49, 2005.

LIONTA, E.; SPYROU, G.; VASSILATIS, D. K.; COURNIA, Z. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p.1923-1938, 2014.

LIU, C. C.; LIU, C. C.; KANEKIYO, T.; XU, H.; BU, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 2, p. 106–118, 2013.

LOMBARDO, S.; MASKOS, U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. **Neuropharmacology**, v. 96, n. 18, p. 255–262, 2015.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 90-100, 2009.

MAZUROV, A. A.; SPEAKE, J. D.; YOHANNES, D. Discovery and development of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulators. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 7943–7961, 2011.

MENG, X.-Y.; ZHANG, H.-X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for StructureBased Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, p. 146-157, 2011.

MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.;LAWANDI, J.; CORBEIL, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. **British Journal of Pharmacology**, v. 153 Suppl, p. S7- 26, 2008.

MOJSA, W. The prevalence of Alzheimer's disease and dementia in Alzheimer's disease in patients of long-term nursing home care in the Podlaskie province in Poland. **Advances in Alzheimer's Disease**, v. 4, n. 3, p. 90–97, 2015.

MOLINO, I.; COLUCCI, L.; FASANARO, A. M.; TRAINI, E.; AMENTA, F. Efficacy of memantine, donepezil, or their association in moderate-severe Alzheimer's disease: a review of clinical trials. **The Scientific World Journal**, p. 1–8, 2013.

MORALES-PEREZ, C. L.; NOVIELLO, C. M.; HIBBS, R. E. X-ray structure of the human $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptor. **Nature**, v. 538, p. 411–415, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 907 p.

OZ, M.; LORKE, D. E.; YANG, K. H. S.; PETROIANU, G. On the interaction of β -amyloid peptides and $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 10, n. 6, p. 618–630, 2013.

PAULA, V. J. R.; GUIMARÃES, F. M.; DINIZ, B. S.; FORLENZA, O. V. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease amyloid-beta, Tau protein or both? **Dementia & Neuropsychologia**, v. 3, p. 188-194, 2009.

PIROLLA, N. F. F. **Modelagem molecular de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ para a doença de Alzheimer**. 2018. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2018.

PITHADIA, A. Pathophysiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease (AD). **Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 1, 2008.

QIU, W. W. Q.; LAI, A.; MON, T.; MWANBURI, M.; TAYLOR, W.; ROSENZWEIG, J.; KOWALL, N.; STERN, R.; ZHU, H.; STEFFENS, D. C. Angiotensin converting enzyme inhibitors and Alzheimer disease in the presence of the apolipoprotein E4 allele. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 22, n. 2, p. 177–185, 2014.

QUIK, M.; ZHANG, D.; MCGREGOR, M.; BORDIA, T. Alpha7 nicotinic receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 97, p. 399–407, 2015.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–16, 2018.

SANTOS, I. T. O.; REGO, D. G.; OLIVEIRA, B. G. A regra de Bent contextualiza a força da ligação de hidrogênio em clusters trimoleculares. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 624–630, 2014.

SCRIMPF, M. R.; SIPPY, K. B.; BRIGGS, C. A.; ANDERSON, D. J.; LI, T.; JI, J.; FROST, J. M.; SUROWY, C. S.; BUNNELLI, W. H.; GOPALAKRISHNAN, M.; MEYER, M. D. SAR of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonists derived from tilorone: exploration of a novel nicotinic pharmacophore. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 1633–1638, 2012.

SPURNY, R.; DEBAVEYE, S.; FARINHA, A.; VEYS, K.; VOS, A. M.; GOSSAS, T.; ATTACK, J.; BERTRAND, S.; BERTRAND, D.; DANIELSON, U. H.; TRESADERN, G.; ULENS, C. Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 19, p. 2543–2552, 2015.

STEAD, L. F.; HUGHES, J. R. Lobeline for smoking cessation. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2012. DOI: 10.1002/14651858.CD000124.pub2.

STRASSNIG, M.; GANGULI, M. About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. **Psychiatry**, v. 2, n. 9, p. 30–33, 2005.

SURESH, A.; HUNG, A. Molecular simulation study of the unbinding of $\alpha 7$ -conotoxin [Y4E]GID at the $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 70, p. 1–39, 2016.

TAHA, M. O.; HABASH, M.; AL-HADIDI, Z.; AL-BAKRI, A.; YOUNIS, K.; SISAN, S. Docking-based comparative intermolecular contacts analysis as new 3-D QSAR concept for validating docking studies and in silico screening: NMT and GP inhibitors as case studies. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, p. 647–669, 2011.

TAHIRA, A. C.; ALMEIDA, S. V.; FERREIRA, S. T. Dementia is an age-independent risk factor for severity and death in COVID-19 inpatients. **Alzheimer's & Dementia**, p. 1–14, 2021.

UMBRICHT, D. M. S.; LOWE, D.; YOO, K.; PORTER, R.; GARIBALDI, G.; SANTARELLI, L.; KEEFE, R. The effect of the partial nicotinic alpha7 receptor agonist R3487 on cognitive deficits in schizophrenia. In: **48th annual meeting of American college of neuropsychopharmacology**, 2009.

VAN NORMAN, G. A. Drugs, Devices, and the FDA: Part 1: An Overview of Approval Processes for Drugs. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 1, p. 170–179, 2016.

VIEGAS, F. P. D.; SIMÕES, M. C. R.; ROCHA, M. D.; CASTELLI, M. R.; MOREIRA, M. S.; VIEGAS-JUNIOR, C. Doença de Alzheimer: caracterização, evolução e implicações do processo neuroinflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 286–306, 2011.

WALLACE, T. L.; BERTRAND, D. Neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors as a target for the treatment of schizophrenia. **International Review of Neurobiology**, v. 124, p. 79–111, 2015.

WANG, S.; DONG, G.; SHENG, C. Structural simplification: an efficient strategy in lead optimization. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n. 5, p. 880–901, 2019.

WOLF, A. B.; CASELLI, R. J.; REIMAN, E. M.; VALLA, J. APOE & neuroenergetics: an emerging paradigm in Alzheimer's disease. **Neurology of Aging**, v. 34, n. 4, p. 1–23, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2019 Revision of World Population Prospects**. 2019. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/>. Acesso em: 29 nov. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health estimates**: Life expectancy and leading causes of death and disability. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>. Acesso em: 07 out. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on the public health response to dementia**. 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/344701/9789240033245-eng.pdf>. Acesso em: 07 out. 2021.

ZALLI, M.; FARAH, H. O.; ANTUNES, M. D. Aspectos epidemiológicos e gastos em saúde por demências no Brasil. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 6, p. 563–567, 2020.

ZANALETI, R.; BETTINETTI, L.; CASTALDO, C.; COCCONCELLI, G.; COMERY, T.; DUNLOP, J.; GAVIRAGHI, G.; GHIRON, C.; HAYDAR, S. N.; JOW, F.; MACCARI, L.; MICCO, I.; NENCINI, A.; SCALI, C.; TURLIZZI, E.; VALACCHI, M. Discovery of a novel $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist series and characterization of the potent, selective, and orally efficacious agonist 5-(4-Acetyl[1,4]diazepan-1-yl)pentanoic acid [5-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-3-yl] amide (SEN15924, WAY-361789). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 4806–4823, 2012.

ZHENG, G.; ZHANG, Z.; DOWELL, C.; WALA, E.; DWOSKIN, L. P.; HOLTMAN, J. R.; MCINTOSH, J. M.; CROOKS, P. A. Discovery of non-peptide, small molecule antagonists of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors as novel analgesics for the treatment of neuropathic and tonic inflammatory pain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 2476–2479, 2011.