

AVALIAÇÃO COMPUTACIONAL DO POTENCIAL DE HETEROCICLOS NITROGENADOS COMO INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASEDeivison G. M. dos Santos¹ (IC), Daniel H. S. Leal (PQ)¹¹Universidade Federal de Itajubá**Palavras-chave:** Alzheimer. Docking molecular. Doenças neurodegenerativas. Inibição de enzimas. Modelagem molecular.**Introdução**

A acetilcolina (ACh) atua em diversos sistemas, tais como: o sistema nervoso central (SNC), a comunicação neuromuscular, o sistema nervoso autônomo e o sistema nervoso periférico. No SNC, esse neurotransmissor é encontrado na região interneurônios e em algumas vias colinérgicas importantes de axônio longo. Sua principal atividade está associada à promoção de sinapses neuroquímicas quando ligada a receptores nicotínicos e muscarínicos (ČOLOVIĆ et al., 2013).

A acetilcolinesterase (AChE), presente em variados tipos de tecidos condutores, é uma enzima da família das colinesterases que catalisa a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético (na forma de acetato), a fim de restaurar o estado de repouso de um neurônio colinérgico após sua ativação. Segundo Colovic et al. (2013), essa decomposição ocorre a uma taxa de degradação de 25.000 moléculas de ACh por segundo para cada AChE. Essa reação de hidrólise é responsável pela cessação do impulso nervoso; isto é, após a neurotransmissão, a AChE quebra a molécula de acetilcolina fazendo com que a colina seja recaptada novamente pelo nervo pré-sináptico para um novo ciclo de neurotransmissão.

Dado sua importância, uma grande preocupação é a manutenção do funcionamento desse ciclo de neurotransmissão, ou seja, a razão entre [ACh] e [AChE funcional], que pode ser controlada por intermédio da inibição da enzima. Isso porque existem dois tipos de inibidores: os reversíveis e os irreversíveis. Estes estão, por sua vez, comumente relacionados, respectivamente, com aplicações terapêuticas (tratamentos de doenças neurodegenerativas) e com efeitos tóxicos (armas químicas, agrotóxicos, etc.).

Em síntese, as inibições reversíveis ocorrem com hidrólise da enzima acilada na ordem de minutos e são

complexos que fazem ligações mais fracas, ideal para situações como a doença de Alzheimer (DA) - que possui como marcador biológico a degeneração de neurônios colinérgicos, levando a uma produção reduzida de ACh e consequentemente diversos sintomas característicos da doença, tal como perdas cognitivas. Já as inibições irreversíveis são tipicamente causadas por compostos organofosforados (OP's) que se ligam covalentemente à enzima, promovendo uma dificuldade maior de desfosforilação, que ocorre na ordem de dias gerando acúmulo de ACh e superestimulação dos receptores (crise colinérgica). Esse mecanismo possui duas etapas: a inativação inicial reversível, que é rápida, e a inativação irreversível (geração de um complexo enzima-inibidor muito estável que após um longo período pode passar pela desaliquilação (envelhecimento). Não havendo, nos dias atuais, antídotos universais que desfaçam o envelhecimento da enzima).

Sendo assim, este trabalho focou no estudo de novos potenciais inibidores reversíveis da AChE, por meio de métodos computacionais, isto é, *in silico*, para tratamento de doenças neurodegenerativas.

Metodologia

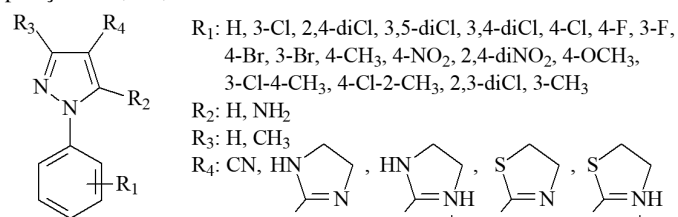
O desenvolvimento deste trabalho foi conduzido integralmente com métodos computacionais de modelagem molecular, abrangendo as etapas de construção e preparação de uma biblioteca molecular, otimização da geometria dos ligantes, cálculos de cargas intramoleculares, análise de superfícies de potencial eletrostático, simulações de *docking* molecular e interpretação de dados obtidos. A seguir, descrevem-se, em ordem cronológica, as etapas e os procedimentos realizados ao longo da pesquisa. Este trabalho constituiu-se de 7 etapas: 1. Planejamento dos compostos; 2. Design molecular; 3. Cálculos de otimização de geometria e energia intramolecular e

“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”

análise conformacional; 4. Mapa de Potencial Eletrostático (MEP); 5. Docking molecular.

1. Os compostos fenil pirazólicos selecionados para este estudo (Figura 1) foram planejados e parte deles sintetizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Maurício Silva dos Santos (IFQ/UNIFEI).

Figura 1 – Estrutura dos derivados de fenil-pirazol substituídos nas posições R1, R2, R3 e R4.



2. A partir disso, foi efetuado o desenho dessas moléculas no plano tridimensional por meio do Avogadro. Junto a isso, neste mesmo software, foi realizada uma rápida otimização estrutural através da ferramenta “Auto Optimization Tool” que, por sua vez, utiliza o Campo de Força Universal (UFF) - um modelo de campo de força determinado a partir de regras genéricas com base em cada elemento da tabela periódica, utilizando apenas sua hibridização e sua conectividade.

3. Logo após essa etapa, foi necessário utilizar o BIOVIA Discovery Studio para corrigir as ligações intramoleculares e adicionar as cargas formais e parciais.

Posteriormente, através do Gaussian View 6.0 foi realizada a parametrização dos arquivos para posterior cálculo de otimização geométrica (e análise conformacional automática, pelo próprio software, para determinar a pose de menor energia) e de energia interna no Gauss 09W. Assim, os protocolos utilizados foram:

- Para a otimização: abordagem semi-empírica PM3 (Parametric Method 3), carga adequada ao estado de ionização da molécula com *spin* definido em “singlet” e em meio aquoso determinado via modelo de solvente contínuo IEFPCM (*Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model*), que considera os efeitos de solvatação implícita da água (Tomasi et al., 2005).

- Para o cálculo da energia no ponto: foi utilizado o método DFT (*Density Functional Theory*), com o funcional híbrido B3LYP, e conjunto de base 6-31G(d,p), que incorpora funções de polarização para descrever com maior precisão os efeitos eletrônicos. O cálculo foi conduzido com camadas fechadas (singlet).

Para considerar os efeitos do meio de reação, utilizou-se o modelo de solvatação implícita IEFPCM com água como solvente.

Para avaliar as cargas, foram utilizados dois modelos: CHELPG (*Charges from Electrostatic Potentials using a Grid based method*) e MBS (*Minimal Basis Set*).

4. Já na seguinte etapa, a superfície de ESP foi gerada no Gaussian View 16 com base na densidade eletrônica total da molécula, utilizando o método SCF (Self-Consistent Field), que garante uma distribuição de carga bem estável.

A partir dos arquivos “Checkpoint file” (*.chk) gerados com cargas CHELPG foi possível fazer os estudos das superfícies de potencial eletrostático. A análise ocorreu com a geração de um arquivo *.cub e análise do esquema de cores de cada região de cada uma das moléculas.

Os parâmetros utilizados para a geração da superfície foram “Cube”, “Total density” e “Density Matrix SCF”, com “Grid” definido como “Coarse”. Além disso, para a superfície, o valor selecionado de densidade foi 0,002 para a geração de uma nova superfície mapeada do tipo “ESP” e com a matriz de densidade novamente especificada em “SCF”.

5. Com os arquivos já prontos, foi realizado um docking robusto. O docking molecular é uma ferramenta de simulação computacional essencial no planejamento racional de fármacos, permitindo prever a orientação e a afinidade de ligação de um ligante a uma molécula-alvo.

Para esta pesquisa, o software Molegro Virtual Docker (MVD) foi utilizado. Ele utiliza o algoritmo MolDock, uma variação do algoritmo de busca por evolução diferencial, que permite a realização de uma amostragem eficiente do espaço conformacional, e calcula a energia de ligação considerando forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e efeitos de

“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”

solvatação.

Além disso, a função de pontuação do MolDock é uma extensão do potencial linear por partes (Piecewise Linear Potential - PLP), incluindo termos adicionais para interações de hidrogênio e eletrostáticas.

Com o software DSV, a enzima AChE foi preparada a partir da estrutura 4MOE proveniente da base RCSB.

Com o software Molegro Virtual Docker foi possível dar início à simulação de docking molecular. Todos os compostos em formato MOL2 (desde enzimas, ligantes e compostos cristalográficos de referência) foram importados para a área de trabalho do software para preparação.

Na etapa de preparação, as cargas e os átomos não-polares não foram corrigidos. Uma cavidade de 431,104 Å presente no sítio ativo da enzima foi selecionada como espaço de busca para um raio de até 15 Å. Todos os resíduos presentes no sítio ativo foram considerados flexíveis. Para cada ligante foram realizadas 20 corridas com armazenamento de 20 poses por corrida. Os algoritmos selecionados foram o MolDock Optimizer (amostragem) e MolDock Score (pontuação e classificação).

Para o redocking, foi selecionada como referência a pose cristalográfica do composto di-hidrotanshinona, encontrada na estrutura 4MOE.

Resultados e discussão

De maneira geral, o substituinte NH₂ exibe potencial muito positivo nos átomos de H - favorecendo interações com ligação de H -, e essencialmente neutro para o átomo de N, o que reduz as repulsões eletrostáticas da região quando este grupo aparece na posição X. Já o átomo de H na posição X tende a manter, frequentemente, a região mais neutra e, logo, contribui menos para ligações de H.

Considerando os efeitos dos substituintes CH₃ ou H na posição Y, foi observado que o grupo CH₃ possui hidrogênios muito discretamente positivos, favorecendo o aparecimento de regiões hidrofóbicas que fomentam a ancoragem dos ligantes a partes hidrofóbicas da enzima.

Quando se trata do grupo ciano (CN), o potencial

apresentado demonstrou comportamento majoritariamente muito negativo, formando uma área altamente eletrofílica.

O anel pirazol, por sua vez, presente em todas as estruturas, manteve-se essencialmente neutro em quase todas as moléculas. Porém, o átomo N-2 (N mais próximo a R3 ou Y) obteve pequenas variações, sendo geralmente ligeiramente negativo. Isso indica que esse anel não tem capacidade de promover repulsões eletrostáticas com grupos de mesma carga.

A presença de grupos aromáticos com substituintes como nitro (NO₂) e halogênios influenciou a distribuição eletrostática nas superfícies, fomentando uma alta concentração de carga negativa nas regiões mais próximas.

Já na posição Z (R4), os compostos sulfurados (tiazolidinas) se destacaram, sendo que regiões do anel tiazolidínico ficaram com átomos de hidrogênio muito discretamente positivos e com o átomo de enxofre neutro ou levemente positivo. Já os átomos de nitrogênio exibiram regiões com cargas muito discretamente a levemente negativas.

O fator da coplanaridade pode ter oferecido maior sobreposição de orbitais π , provocando um possível aumento de interações π - π com resíduos aromáticos. No entanto, as moléculas com melhores escores foram observadas sendo não coplanares, sugerindo que a flexibilidade conformacional favorece o encaixe.

Quanto ao Docking Molecular, ao analisar as 32 melhores posições foi possível identificar uma diferença de -28,93 Kcal/mol entre a média do score da donepezila ácida e básica (-173,54 Kcal/mol) e a média dos melhores ligantes (-144,61 Kcal/mol), indicando uma boa afinidade do padrão estrutural estudado. E ao isolar os padrões de substituição, foi possível identificar propriedades que aumentam a afinidade do ligante pela enzima:

A frequência de aparecimento dos substituintes 2,4-diNO₂ e 3,5-diCl, na posição R, foram os que mais se destacaram de forma significativa, sendo que o dinitro teve sua ocorrência mais que duplicada em relação ao diCl.

Para os substituintes da posição R4, foi notado que os

“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”

anéis aromáticos, imidazolina e tiazolidina (independentemente de serem ácidos ou básicos) apresentaram resultados consideravelmente melhores que apenas a nitrila.

Já para os substituintes da posição R2 e R3, respectivamente NH₂ e CH₃, foi evidenciado que os grupos mais volumosos apresentaram melhor desempenho em relação a falta do substituinte, provavelmente devido ao efeito eletrônico de doação de elétrons, apesar de possuírem intensidade e mecanismos diferentes entre si.

Conclusões

Ao fim dessa pesquisa, pôde-se concluir que alguns dos heterociclos nitrogenados pirazólicos investigados possuem um bom potencial de inibição da AChE, sendo seus resultados de interação e afinidade pela enzima (MolDock Score) comparáveis aos de compostos já em uso no mercado como a donepezila.

Dessa forma, foi possível definir que: substituintes como o grupo NH₂ são boas opções para proporcionar a ancoragem no sítio ativo a partir da posição R2, ao mesmo tempo que grupos apolares (como o CH₃) na posição R3 podem se ligar a bolsões apolares da enzima e que heterociclos básicos sulfurados e nitrogenados oferecem melhor estabilidade na formação dos complexos enzima-ligante.

Além disso, substituintes nitrogenados ou haletos no anel fenila tendem a gerar regiões mais polares facilitando a interação entre ligante-enzima. E os substituintes 2,4-diNO₂ e 3,5-diCl apresentaram os menores escores.

Por fim, embora a coplanaridade dos ligantes favoreça maior sobreposição de orbitais π e interações π - π , as moléculas não coplanares mostraram-se mais flexíveis e com melhor adaptação ao sítio ativo.

Diante deste cenário, estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários, além de estudos como o de toxicidade.

Agradecimentos

Gostaria de expressar gratidão à Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) pela oportunidade de desenvolvimento acadêmico, científico e pessoal. E

reconhecê-la pelo empenho em proporcionar infraestrutura e oportunidades especiais e necessárias para formação, aprimoramento de habilidades e aquisição de conhecimentos técnicos e científicos.

Agradeço em especial ao orientador, Daniel Henriques Soares Leal, pela orientação, tempo e dedicação investidos no projeto. Ademais, agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta pesquisa, seja docentes envolvidos no projeto geral, seja outros colegas estudantes que se dedicaram a produzir resultados que puderam ser utilizados para discussão e embasamento deste trabalho.

Referências

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648782/>. Acesso em: 27 maio 2025.

RAPPÉ, A. K.; CASEWIT, C. J.; COLWELL, K. S.; GODDARD III, W. A.; SKIFF, W. M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114, n. 25, p. 10024–10035, 1992. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja00051a040>. Acesso em: 30 maio 2025.

MEZA, Juan C. Steepest Descent. Berkeley: Lawrence Berkeley National Laboratory, 2006. Relatório Técnico. Disponível em: https://crd.lbl.gov/assets/pubs_presos/983240.pdf. Acesso em: 30 maio 2025.

MAYO, S. L.; OLAFSON, B. D.; GODDARD III, W. A. DREIDING: A generic force field for molecular simulations. *Journal of Physical Chemistry*, Washington, v. 94, n. 26, p. 8897–8909, 1990.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm051197e>. Acesso em: 30 maio 2025.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical Reviews*, Washington, v. 105, n. 8, p. 2999–3093, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr9904009>. Acesso em: 30 maio 2025.