



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E
BIOLÓGICA**

FLÁVIA MYLLA DE SOUSA REIS

**ESTUDOS DE *DOCKING MOLECULAR* ENTRE TERPENOS E O
RECEPTOR GABA-A NA ELUCIDAÇÃO DE SEUS MECANISMOS
DE AÇÃO ANTICONVULSIVANTE**

**PETROLINA-PE
2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E
BIOLÓGICA**

FLÁVIA MYLLA DE SOUSA REIS

**ESTUDOS DE *DOCKING MOLECULAR* ENTRE TERPENOS E O
RECEPTOR GABA-A NA ELUCIDAÇÃO DE SEUS MECANISMOS
DE AÇÃO ANTICONVULSIVANTE**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF, Campus Petrolina-PE, como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Edilson B. de Alencar Filho

Co-orientador interno: Prof. Dr. Rodrigo F. do Carmo

Co-orientador externo: Prof. Dr. Diogo V. da Fonseca

**PETROLINA-PE
2021**

R375e Reis, Flávia Mylla de Sousa
Estudos de *docking molecular* entre terpenos e o receptor GABA-A na elucidação de seus mecanismos de ação anticonvulsivante / Flávia Mylla de Sousa Reis. – Petrolina-PE, 2021.
xii, 60 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e Biológica) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Besera de Alencar Filho.

Inclui referências.

1. *Docking molecular*. 2. Farmacologia. 3. Terpenos. 4. Anticonvulsivante. 5. Química farmacêutica. I. Título. II. Alencar Filho, Edilson Besera de. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 615.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

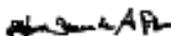
FLÁVIA MYLLA DE SOUSA REIS

**ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR ENTRE TERPENOS E O RECEPTOR
GABA-A NA ELUCIDAÇÃO DE SEUS MECANISMOS DE AÇÃO
ANTICONVULSIVANTE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase na linha de pesquisa: Saúde, Sociedade e Ambiente, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

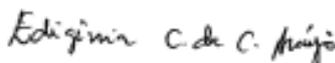
Aprovada em: 03 de setembro de 2021

Banca Examinadora



Edilson Beserra de Alencar Filho (2 de September de 2021 11:54 AM)

Edilson Beserra de Alencar Filho, Doutor
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf



Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo, Doutora
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf



Gabriela Lemos de Azevedo Maia, Doutora
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf

*À minha família e todos que contribuíram com essa
vitória...*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado uma família que me apoia em todas as minhas decisões. Agradeço ao meu pai, Francisco Reis que, por vezes abdicou de suas vontades em prol do bem maior das suas filhas, me orientou e acompanhou-me em toda minha caminhada academia e profissional. À minha mãe, Anailda Reis, pelo seu zelo, cuidado e orações nos meus dias de correria. À minha irmã, Fernanda Reis, pelo ombro amigo, parceria profissional e porto seguro nos momentos mais desgastantes e difíceis. A meu afilhado, João Benjamin, por me proporcionar um sentimento maternal e ver seu crescimento leva-me a querer realizar meus sonhos para que futuramente eu consiga realizar os sonhos dele. Ademais, a todos familiares que participaram desta fase da minha vida de alguma forma.

Agradeço a meus amigos que por vezes incentivaram-me e ajudaram-me. Especialmente, à Ana Carolina por me acolher em Petrolina e sempre estar disposta a ouvir-me e orientar-me independentemente de quais circunstâncias estamos vivendo. À Renata Rodrigues, amiga que a UFPI deu-me e o mestrado fortaleceu nossa amizade, obrigada pelas conversas sobre as dificuldades da pós graduação, por tirar um pouco do seu tempo para me dar sugestões e acima de tudo pelo pensamento positivo. À Érica Amorim, por ser meus olhos e ouvidos e sempre me aconselhar nos momentos de dúvidas. À Iliene, Amanda, Marcos, Larissa, Chico pelo cuidado diário. Aos outros, que estão sempre comigo, minha muito obrigada!

Por fim, agradeço ao meu orientador, Dr. Edilson Beserra, por me aceitar como orientanda e ensinar-me do zero tudo sobre modelagem molecular. Por vezes exigente, mas sempre respeitando nossos limites, saúde e bem estar. Obrigada por todas as melhorias e sugestões propostas durante a pós graduação. Sua orientação foi essencial para meu amadurecimento profissional. Agradeço a Erika Bárbara, aluna de iniciação científica que se tornou uma grande amiga. Obrigada pela paciência! Aos demais, Ieda, Anderson agradeço por cada detalhe que vocês foram cruciais.

Aos meus companheiros de trabalho que por vezes souberam lidar com minha preocupação, à Universidade do Vale do São Francisco (UNIVASF), ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde e Biológica (PPGCSB) e à CAPES.

Por fim, o mestrado me fez ver que sempre há dificuldades na vida, mas nunca estamos sozinhos. Obrigada a todos.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

Os estudos de *docking molecular* envolvem a determinação da melhor disposição (orientação e conformação) de um ligante em uma determinada região de uma macromolécula alvo, através de algoritmos e interfaces gráficas implementados em programas de computador. A realização simultânea do *docking molecular* com estudos farmacológicos vem se tornando uma ferramenta muito importante para agilizar a descoberta de medicamentos modernos, visto que são testadas um grupo de compostos contra um ou mais alvos em um curto período de tempo fornecendo a compreensão da eficiência das interações entre ligante-receptor, além de fornecer uma interdisciplinaridade entre química e farmacologia. Estudos experimentais de bancada indicam que terpenos tetraidrolinalol, mirtenol e nerolidol apresentam atividade anticonvulsivante em camundongos por modular os receptores ácido gama-amino butírico (GABA-AR), com isso o objetivo do trabalho consistiu em realizar o *docking molecular*, especialmente nessas três moléculas. As energias obtidas para esses três terpenos foram comparadas com os resultados de acoplamento molecular de ligantes de conhecida modulação positiva e negativa. Considerando a hipótese proposta pelo trabalho, os terpenos interagem com o GABA-AR, deste modo foi obtido no RCSB *Protein Data Bank* um canal iônico controlado por ligante (GLIC), semelhante à estrutura do GABA-AR, sob código 3P50. Os cálculos de *docking molecular* foram realizados utilizando o programa AutoDock Vina e a interface gráfica Autodock Tools (ADT). As poses, perfis de interação e energias obtidas foram analisados à luz dos dados farmacológicos experimentais. De forma geral, os terpenos tetraidrolinalol, mirtenol e nerolidol interagem com GABA-AR, corroborando com os dados experimentais. Observou-se que dentre os compostos focos do estudo, o nerolidol (-6,8 Kcal/mol) e tetraidrolinalol (-5,6 Kcal/mol) apresentaram as melhores energias visto que conservam o contribuinte responsável pela modulação da macromolécula (hidroxila em C3) e não apresentam grupos polares, entretanto mirtenol mostrou-se com a interação menos estável. Por fim, os terpenos com modulação positiva e negativa apresentaram interação com o GABA-AR como descrito na literatura à exemplo do Carvacrol (-6,6 Kcal/mol) e Tujona (-6,0 Kcal/mol), respectivamente.

Palavras Chaves: Anticonvulsivantes, *docking*, interdisciplinar, terpenos, receptor GABA-A.

ABSTRACT

Molecular docking studies involve determining the best arrangement (orientation and conformation) of a ligand in a specific region of a target macromolecule, through algorithms and graphical interfaces implemented in computer programs. Simultaneous carrying out of molecular docking with pharmacological studies becomes a very important tool to speed up the discovery of modern drugs, since a group of compounds are tested against one or more targets in a short period of time, providing the knowledge about the efficiency of interactions between ligand-receptor, in addition to providing an interdisciplinary relationship between chemistry and pharmacology. Experimental bench studies indicate that the terpenes tetrahydrolinalol, myrtenol and nerolidol have anticonvulsant activity in mice because they modulate the gamma-amino butyric acid (GABA-A_R) receptors, thus the aim of the paper was to perform molecular docking, specially in these three molecules. The energies reached for these three terpenes were compared with the results of molecular docking of ligands with known positive and negative modulation. Considering the hypothesis proposed by the paper, terpenes interact with GABA-A_R, thus a ligand-controlled ion channel (GLIC) was obtained in the RCSB Protein Data Bank, similar to the structure of GABA-A_R, under code 3P50. Molecular docking calculations were performed using the AutoDock Vina program and an AutoDock Tools (ADT) graphical interface. The poses, interaction profiles and energies released were in the light of experimental pharmacological data. In general, the terpenes tetrahydrolinalol, myrtenol and nerolidol interact with GABA-A_R, corroborating the experimental data. It was observed that among the focus compounds of the study, nerolidol (-6.8 Kcal/mol) and tetrahydrolinalol (-5.6 Kcal/mol) had the best energies since they conserve the contributor responsible for the modulation of the macromolecule (hydroxyl in C3) and do not have polar groups, however myrtenol showed the least stable interaction. Ultimately, terpenes with positive and negative modulation showed interaction with GABA-A_R as described in the literature, like Carvacrol and Tujona (-6.0 Kcal/mol), respectively.

Keywords: Docking, terpenes, anticonvulsants, GABA-A Receptor, interdisciplinary.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Subunidades do receptor GABAA.....	19
Figura 2 - Domínios TMD (transmembranar) e ECD (extracelular) do GABA-A _R	20
Figura 3 - Redocking do Propofol, Petrolina 2021.....	36
Figura 4 - RMSD entre o homólogo bacteriano pLGIC (3P50) e o GABA-A _R com mesma sequência proteica de humanos (3X3Z), Petrolina 2021.....	37
Figura 5 - Melhores poses de encaixe para os enantiómeros S e R do Tetraidrolinalol comparando com os nativos Propofol, Petrolina 2021.	40
Figura 6 - Ambiente de interação do Tetraidrolinalol R (A) e S (B) no sitio nativo Propofol, Petrolina 2021.....	41
Figura 7 – Moléculas do propofol (amarelo) e tetraidrolinalol (azul) sobrepostos, Petrolina 2021.....	43
Figura 8 - Melhores poses de encaixe para os enantiómeros S e R do Nerolidol comparando com o nativo Propofol, Petrolina 2021.	47
Figura 9 - Ambiente de interação do Nerolidol Z S(A)/R(B) e Nerolidol E S(C)/R(D) no sitio nativo Propofol, Petrolina 2021.....	48
Figura 10 - Moléculas do linalol (azul) e nerolidol (amarelo) sobrepostos, Petrolina 2021.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Construção das estruturas dos monoterpenos com as possíveis configurações dos centros estereogênicos, Petrolina 2021.	34
Tabela 2 - Valores de energias de ligação entre o tetrahidrolinalol e análogos com o receptor GABA-A complexado ao Propofol (3P50), Petrolina 2021.....	38
Tabela 3 - Valores de energias de ligação do Propofol com a macromolécula 3P50, Petrolina 2021.....	39
Tabela 4 - Ambiente de interação do Tetrahidrolinalol e análogos no sitio nativo do Propofol, Petrolina 2021.....	42
Tabela 5 - Valores de energias de ligação entre o Nerolidol e análogos com o receptor GABA-A complexado ao Propofol (3P50), Petrolina 2021.....	45
Tabela 6 - Ambiente de interação do Nerolidol e análogos no sitio nativo do Propofol, Petrolina 2021.....	50
Tabela 7 - Ambiente de interação do Mirtenol e análogos no sitio nativo do Propofol, Petrolina 2021.....	51
Tabela 8 - Valores de energias de ligação do Mirtenol e análogos com modulação negativa com o receptor GABA-A complexado ao Propofol (3P50), Petrolina 2021. ..	52
Tabela 9 - Valores de energias de ligação dos análogos com modulação positiva do Mirtenol com o receptor GABA-A complexado ao Propofol (3P50), Petrolina 2021...	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT ₃	5-hidroxitriptamina
ADT	<i>Autodock Tools</i>
ASN	Asparagina
CADD	<i>Computer-Assisted Drug Design</i>
Cl ⁻	Íons de cloreto
Cys-loop	Dissulfeto de cisteína
DM	<i>Docking molecular</i>
DNA	Ácido nucléico
ECD	Domínio extracelular
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA-A _R	Receptor GABA-A
GLIC	Canal Iônico controlado por Ligante
HF	<i>Hartree-Fock</i>
ICD	Domínio intracelular
ILE	Isoleucina
LEU	Leucina
MES	Choque máximo
MET	Metionina
MM	Modelagem molecular
MT	Mirtenol
nAChR	Acetilcolina nicotínica
NL	Nerolidol
PFL	Propofol
PHE	Fenilalanina
PLC	Glutamina
PRO	Prolina
QM	Mecânica quântica
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RCSB-PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	Ácido nucléico

scMET	Pentilenotetrazole
SNC	Sistema Nervoso Central
TG	Gânglio trigêmeo
THL	Tetrahidrolinalol
THR	Treonina
TMD	Domínio transmembranar
TYR	Tirosina
TYR	Tirosina
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
ZAC	Canal iônico ativado por zinco

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	15
2.0	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3.0	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	RECEPTOR GABA-A (GABA-A _R)	18
3.2	MODELAGEM MOLECULAR.....	21
3.2.1	<i>Docking molecular</i>	23
3.3	TERPERNOS.....	28
4.0	METODOLOGIA.....	31
4.1	TIPO DE ESTUDO E LOCAL DA PESQUISA.....	31
4.2	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO ALVO MACROMOLECULAR	31
4.3	OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS LIGANTES E OTIMIZAÇÃO DE GEOMETRIA	32
4.4	<i>DOCKING MOLECULAR</i> DOS MONOTERPENOS COM A MACROMOLÉCULA 3P50	32
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	<i>DOCKING MOLECULAR</i> DOS MONOTERPENOS COM A MACROMOLÉCULA 3P50	36
6.0	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS	58

1.0 INTRODUÇÃO

Com a química computacional a estratégia no Planejamento Racional de Compostos tornou-se uma ferramenta para investigar as interações químicas de um ligante ao seu receptor e explorar os fatores estruturais relacionados ao mecanismos de ações dos fármacos (CARVALHO et al., 2003). De forma geral, dentro da química computacional, existe a modelagem molecular como alternativa para investigar as estruturas e propriedades moleculares. Através da soma de um modelo molecular com uma técnica computacional é possível caracterizar adequadamente o comportamento das moléculas, podendo apresentar desde abordagens centradas principalmente nos ligantes ou visando o complexo ligante e proteína-alvo (VERLI e BARREIRO, 2005).

Neste contexto, o *docking molecular* é um procedimento da química computacional que prevê a melhor disposição (orientação e conformação) de um complexo alvo-ligante, onde o alvo é geralmente uma proteína ou um ácido nucleico molécula (DNA ou RNA) e o ligante é um pequena molécula ou outra proteína. O método compreende duas etapas, primeiramente usa um algoritmo de busca para encontrar o melhor posicionamento do ligante, baseando-se na estabilização do complexo ligante à macromolécula e posteriormente aplica-se uma função de classificação (*score function*), no qual utiliza um campo de força para determinar a energia de estabilização (DIAS et al., 2008).

Continuando no cenário de acoplamento molecular, o mesmo é utilizado em paralelo a dados experimentais por meio de interfaces gráficas e algoritmos de validação onde são testadas um grupo de compostos contra um ou mais alvos em um curto período de tempo. Deste modo, tornando-se uma ferramenta muito importante para agilizar a descoberta de medicamentos modernos, fornecendo a compreensão da eficiência das interações entre ligante-receptor, além de garantir a interdisciplinaridade entre química e farmacologia (KITCHEN et al., 2004; SIVAKUMAR et al 2020).

Considerando os composto terpenóides, estes são classificados como metabólitos secundários de plantas que atravessam a barreira hematoencefálica e modulam a função cerebral (BIANCHINI et al., 2017). Alguns estudos sobre modos de ação de alguns terpenóides revelam que estes apresentam vários alvos proteicos possíveis no sistema nervoso, sendo um deles os receptores ionotrópico ácido γ -aminobutírico (GABA). Publicações de dados experimentais ratificam a modulação à nível molecular

dos terpenos nos receptores ácido gama-amino butírico (GABA-A_R) ao usá-los para reverter efeitos epilépticos induzidos em camundongos (FONSECA et al., 2016).

Dentre esses terpenos destaca-se o linalol e seus derivados, Tetraidrolinalol (THL), mirtenol (MT), nerolidol (NL), com potencial atividade ao modular GABA-A_R. Estes derivados do linalol estão sendo testados por um grupo de pesquisa que já apresentam dados farmacológicos publicados, levando o presente trabalho a escolher as referidas moléculas como objeto de estudo. Do ponto de vista químico, essas moléculas apresentam relação estrutural, físico-química e mecanismo de ação equivalentes ao anestésico e sedativo Propofol, do qual também apresenta interações em sítios específicos na região transmembranar do GABA-A_R (MILANOS et al., 2017; NURY et al., 2011).

O estudo de *docking molecular* analisa a conformação e a orientação (conjunto de “poses”) das moléculas no local de ligação de um alvo macromolecular para isso a estrutura da proteína deve estar previamente disponível em banco de dados on-line, como o RSCB PDB (*Protein Data Bank*), ou ser obtida por modelagem por homologia (TORRES et al., 2019). Nury et al., (2011), publicaram um depósito da estrutura cristalográfica do agonista Propofol complexados em um canal iônico controlado por ligante (GLIC), semelhante à estrutura do GABA-A_R, servindo de ponto de partida para estudo de interação desses terpenos com suposta ação anticonvulsivante.

Deste modo, a proposta do presente trabalho é realizar um estudo interdisciplinar, aplicando química computacional, através da realização do *docking molecular* nos terpenos tetraidrolinalol, nerolidol e mirtenol, em comparativo com estudos farmacológicos, visto que existem evidências experimentais desses terpenos agindo à nível de GABA-A_R, permitindo assim, um melhor entendimento de sua suposta ação anticonvulsivante. Além de realizar um confrontação entre os resultados de modelagem dos três terpenos com as energias de ligação dos ligantes estruturalmente associados e de conhecida modulação positiva e negativa.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo *in silico*, via *docking molecular*, para contribuir na elucidação de dados experimentais de bancada, os quais apontam que os terpenos tetrahidrolinalol, nerolidol e mirtenol possuem ação anticonvulsivante em camundongos envolvendo a via de modulação do receptor GABA-A (GABA-A_R).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e editar a estrutura do alvo GABA-A_R, complexado com o anestésico propofol, a partir de banco de dados cristalográfico on-line (RCSB-PDB);
- Realizar a avaliação das condições do algoritmo do programa Autodock Vina que melhor representem as características do complexo obtido no banco de dados (*redocking*);
- Usar o *docking molecular* para investigar o mecanismo de ação anticonvulsivante de terpenos obtidos de fontes naturais, nerolidol, mirtenol e tetrahidrolinalol, com evidências experimentais de ação biológica sobre o GABA-A_R visando estabelecer os melhores modos de interação e possíveis relações estrutura-afinidade;
- Comparar os dados de modelagem dos 03 terpenos em foco com ligantes estruturalmente associados e de conhecida modulação positiva (linalol e metabólitos, carvacrol, timol, eugenol, (+), mentol, tagetona, clorotimol, (+)-carvona, (-)-carvona) e negativa (tujona) no GABA-A_R;
- Fornecer discussões para os dados experimentais e padrões estruturais para futuros cálculos de dinâmica molecular a partir dos resultados obtidos;
- Avaliar a importância da interdisciplinaridade entre química e farmacologia.

3.0 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RECEPTOR GABA-A (GABA-AR)

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no Sistema Nervoso Central (SNC) exercendo um importante papel na inibição da função cerebral. A disfunção ou deficiência do sistema GABAérgico implica na epilepsia, dor e ansiedade, uma vez que o mesmo é reconhecido como um importante alvo para atividades sedativas, ansiolíticas, anestésicas gerais e anticonvulsivantes (WANG e HEINBOCKEL, 2018; CORVALÁN et al., 2009). Sendo assim, o aumento da inibição neural por GABA é uma estratégia terapêutica interessante para o tratamento de doenças que afetam o sistema nervoso (SNC), como transtornos de ansiedade, distúrbios do sono, espasmos musculares e convulsões desordens (HOSSAIN et al., 2004).

Este neurotransmissor ativa os receptores ácido gama aminobutírico (GABA), classificados em GABA-A, GABA-B e GABA-C, desencadeando atividade inibitória na membrana sináptica do SNC. Os receptores GABA-A e GABA-C funcionam como canais seletivos à ânions que são permeáveis a íons cloreto (Cl⁻), enquanto os receptores GABA-B são receptores acoplados à proteína G (LEE et al., 2015).

Os GABA-ARS pertencem à superfamília dos receptores Cys-loop, canais iônicos controlados por ligante, altamente expressos em diferentes áreas do cérebro como córtex, bulbo olfatório, tronco cerebral e hipocampo (MILANOS et al., 2018), sendo representados pelo receptores da acetilcolina nicotínica (nAChR), o 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃), o canal iônico ativado por zinco (ZAC) e a glicina. São canais iônicos que possuem seletividade à ânions, após a ativação do agonista, ocorre influxo de Cl⁻, hiperpolarizando a membrana, e conseqüentemente inibe a excitação neuronal. A estrutura dos canais GABA-A é determinada por cinco subunidades que se organizam em uma estrutura semelhante a uma roseta para formar o poro do canal iônico (Figura 1). Existem 19 subunidades diferentes no GABA-AR, com codificadores para cada subunidades do receptor (α1-6, β1-4, γ1-3, δ, ε, ", ρ1-2, ρ), que formam pelo menos 14 combinações distintas *in vivo*, o que representa a versatilidade fisiológica e seletividade farmacológica desses canais (LAVERTY et al., 2017; MILANOS et al., 2017; CHIODI et al., 2018).

Figura 1- Subunidades do receptor GABAA.



Fonte: *Protein Data Bank*, 2021. Legenda: Subunidades formando uma roseta.

Cada subunidade deste receptor é alongada e associa-se à membrana com seus longos eixos criando uma parede contínua em torno do caminho condutor de íons central, formando uma rede simétrica, quádrupla e arredondada quando visto da fenda sináptica. Para todos os membros da superfamília de receptores nicotínicos as subunidades do receptor GABA-A contêm um grande domínio N-terminal extracelular hidrofílico de aproximadamente 200 aminoácidos formado uma ponte de dissulfeto de cisteína (Cys-loop) seguido por quatro sequências transmembranares (M1-M4) (GOETZ et al., 2007; SINGEL e STEINMANN, 2012).

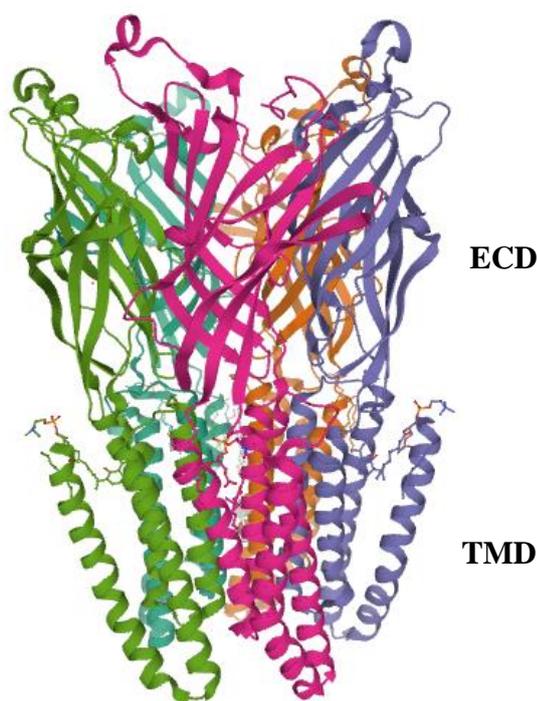
As sequências transmembranares M2 alinha o canal iônico. Entre M3 e M4 há uma grande alça intracelular envolvida na modulação por fosforilação. Uma série de proteínas foram descritas que interagem com a alça intracelular entre M3 e M4 das subunidades específicas do receptor GABA-A. Estas proteínas demonstram desempenhar papéis importantes no tráfego de receptores e ancoragem dos mesmos no citoesqueleto da membrana pós-sináptica (SINGEL e STEINMANN, 2012).

Sendo assim, cada subunidade do GABA-A_R é composta por três domínios. Primeiramente, o domínio extracelular (ECD), contém dez fitas β (β1-10), uma α-hélice e o sítio de ligação ortostérico, o domínio transmembranar (TMD) compreende quatro hélices (TM1-4), o TM2 de cada subunidade forma o poro do íon e por fim o domínio intracelular (ICD), entre TM3 e TM4, que é um local para modificação pós-tradução que

interage com proteínas de tráfego (Figura 2) (CHIODI et al., 2019). Cada domínio tem aproximadamente 20 aminoácidos e uma grande alça intracelular entre TM3 e TM4. Com relação ao domínio extracelular, este contém dois sítios de ligação ao GABA que, quando ocupados, induzem abertura do canal e subsequente dessensibilização (WILLIAMS e AKABAS, 2002). Deste modo mensagens químicas são convertidas em sinais elétricos em fração de milissegundos após a ligação de duas moléculas de GABA nas subunidades α e β do receptor, induzindo uma mudança conformacional que abre o canal iônico (GOETZ et al., 2007).

O domínio ECD da subunidade α é crucial para a ligação do GABA no seu sítio interfacial entre as subunidades β e α . Notavelmente, elementos estruturais na região TMD do α influenciam fortemente o propriedades biofísicas e farmacológicas do GABA- A_R individual e subtipos (LAVERTY et al., 2017).

Figura 2 - Domínios TMD (transmembranar) e ECD (extracelular) do GABA- A_R .



Fonte: *Protein Data Bank*, 2021. Legenda: Domínio transmembranar (inferior) e domínio extracelular (inferior).

Os receptores GABA-A_R apresentam locais de ligação diretos onde ligam-se agonistas e antagonistas e múltiplo locais alostéricos para ligação de tranquilizantes como benzodiazepínicos, barbitúricos, depressores do sistema nervoso central, entre outros (HOSSAIN et al 2004).

O sítio de ligação ortostérico está localizado entre as subunidades α e β que compreendem os componentes complementar e principal, respectivamente. O sítio contém sete laços de ligação não contíguos (A-G), sendo A a C pertencente ao lado principal, enquanto os laços D a G fazem parte do lado complementar (CHIODI et al., 2019). Segundo Goetz et al., (2007) o sitio de ligação para o neurotransmissor GABA está localizada na interface entre as subunidades α e β e para os benzodiazepínicos está na interface das subunidades A e G. O espaço de ligação ao agonista é formado pelos loops A, B, C, D e E cada um com resíduos de aminoácidos que influenciam a ligação, a potência e a eficácia do ligante ao receptor. O principal subtipo no sistema nervoso central é o $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ Os GABA-A_R que responde por 43% de todos os receptores GABA-A e 90% dos receptores nos neurônios do gânglio trigêmeo (TG) (CHIODI et al., 2019; LEE et al., 2015)

3.2 MODELAGEM MOLECULAR

Com o rápido desenvolvimento de hardware, software e algoritmos de computador, a triagem e o design de drogas têm se beneficiado muito de vários métodos computacionais que reduzem o tempo e o custo do desenvolvimento de medicamentos. Dentro deste contexto, a modelagem da estrutura molecular, por métodos computacionais, surgiu como alternativa, especialmente após o desenvolvimento de programas, que visa a construção, edição e visualização, além da análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos. Devido aos grandes avanços no desenvolvimento de novos algoritmos e nas melhorias feitas no poder de computação, o campo da química computacional se tornou uma ferramenta comum na pesquisa e descoberta de drogas de ponta na indústria (LADEFOGED et al., 2019; LIN et al., 2020).

A modelagem molecular pode ser vista como a soma de dois componentes: um modelo molecular e uma técnica computacional para caracterizar adequadamente o comportamento das moléculas. Os estudos de modelagem molecular começam com a geração de um modelo da molécula sob investigação, onde os modelos são gerados no computador e definidas as posições relativas dos átomos no espaço por um conjunto de

coordenadas cartesianas. Uma geometria inicial razoável e confiável determina essencialmente a qualidade dos cálculos (CASALINI et al., 2019; CINAR, 2017).

Com isso, Modelagem molecular, investiga estruturas e propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias. O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD “Computer-Assisted Drug Design”) auxilia na investigação das interações químicas de um ligante com o seu receptor e exploração dos fatores estruturais, como mecanismos de ações moleculares dos fármacos, relacionados ao efeito biológico (CARVALHO et al., 2003). Assim, o mesmo utiliza estratégias como planejamento direto ou dependente do receptor e o planejamento indireto ou independente do receptor, observando a disponibilidade ou não da estrutura tridimensional do alvo macromolecular (SÁ, 2014).

Deste modo, a aplicação de metodologias de modelagem molecular e do CADD viabilizam a construção de modelos moleculares tridimensionais e matemáticos relacionados a um grupo de moléculas que, após passarem por programas computacionais específicos, permitem visualizar, simular e interpretar sistemas inter-relacionados no reconhecimento molecular entre ligante-macromolécula alvo, além de prever o comportamento de outras moléculas, não consideradas na construção dos modelos (SÁ, 2014).

Existem principalmente quatro classes de métodos de modelagem molecular, entre eles, a mecânica molecular (MM), estrutura eletrônica, *post-ab initio* e métodos de dinâmica molecular (CINAR, 2017). Estes métodos basicamente diferem quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados. Os campos podem ser totalmente empíricos, como os utilizados em mecânica molecular ou puramente teóricos (métodos *ab initio*), passando pelos chamados métodos semi-empíricos. A aplicação do método é determinada pelo compromisso entre tempo e precisão dos resultados e pela complexidade do sistema a ser analisado (BARREIRO e RODRIGUES, 1997).

A combinação de mecânica quântica (QM) e mecânica molecular (MM) (QM/MM) pode ser usada para estudar as propriedades eletrônicas, simular reações químicas e calcular espectros em uma única simulação, usando as leis da física clássica e um conjunto de dados experimentais, para os diversos tipos de átomos. Os métodos de MM não tratam elétrons, uma vez, que realizam cálculos com base nas interações entre os núcleos. Esta aproximação torna os cálculos de MM bastante baratos, então eles podem

ser usados para sistemas muito grandes (LIN et al., 2020). Por isso, o campo da modelagem por mecânica molecular de proteínas restringe-se a três limitações principais, que são a complexidade química na descrição do sistema, as leis físicas usadas para descrever o sistema, e por fim as limitações para amostragem exaustiva da paisagem de energia livre (LADEFOGED et al., 2019).

Ademais, os métodos de estrutura eletrônica são caracterizados por usar as leis da mecânica quântica em vez da física clássica. A equação fundamental da mecânica quântica é a equação de Schrödinger:

$$(H\Psi=E\Psi) \quad \text{Equação (1)}$$

Os métodos semi-empíricos usam dados experimentais para simplificar o cálculo e resolver uma forma aproximada da equação de Schrödinger. Eles reduzem o custo computacional ao reduzir o número de integrais complexas, por isso são considerados relativamente baratos e fornecem descrições qualitativas razoáveis de sistemas moleculares. Os métodos *ab initio* não usam parâmetros experimentais, em vez disso, eles usam as constantes físicas conhecidas e resolvem a equação diretamente usando apenas os princípios da mecânica quântica. Consequentemente, os mesmos fornecem previsões quantitativas precisas de energias e estruturas. Os métodos semi-empírico e *ab initio* dependem da teoria *Hartree-Fock* (HF) (CINAR, 2017).

De forma geral, aplica-se a modelagem molecular, no ramo química medicinal, usa abordagens centradas principalmente nos ligantes (fármacos, “lead-compounds”, etc), como por exemplo o QSAR, bem como abordagem entre complexo ligante e sua proteína-alvo (VERLI, 2005). Sendo assim, *docking molecular* associado com a dinâmica molecular representam grande impacto no planejamento e design de novas drogas associado à pesquisas experimentais.

3.2.1 Docking molecular

O *Docking molecular* (DM) analisa a conformação e a orientação (conjunto de “poses”) das moléculas no local de ligação de um alvo macromolecular (TORRES et al., 2019), este é comumente utilizado na descoberta de medicamentos modernos, fornecendo a compreensão da eficiência das interações entre medicamento-receptor, além

de facilitar o entendimento sobre a seletividade de um medicamento para diferentes alvos e a potência de medicamentos diversos em um único alvo (SIVAKUMAR et al., 2020).

A técnica teve sua primeira aparição em meados da década de 1970, quando foi desenvolvido pela primeira vez para investigar o reconhecimento molecular entre moléculas grandes e pequenas. Atualmente, é amplamente utilizado como auxílio para diferentes programas que desenvolvem novas drogas, sendo empregada em processos como, identificação e otimização de acertos, reposicionamento de drogas, identificação *posterioritarget* (triagem reversa), projeto *multi-targetligand* e reposicionamento. Além disso, o *docking* permite compreender as relações entre os diferentes alvos moleculares envolvidos em uma determinada doença com alta relevância para a farmacologia (PINZI e RASTELLI, 2019).

Técnicas de modelagem molecular que facilitam a descoberta de drogas baseiam-se em ligantes e estruturas. Estes usam informações derivadas do conhecimento da estrutura 3D de um alvo de interesse, permitindo classificar bancos de dados de moléculas de acordo com a complementaridade estrutural e eletrônica dos ligantes a um determinado alvo. Nesse contexto, o *docking molecular* é um métodos *in silico* baseado em estrutura, que auxiliam na previsão das interações que ocorrem entre moléculas e alvos biológicos. Este processo é geralmente realizado primeiro prevendo a orientação molecular de um ligante dentro de um receptor e, em seguida, estima-se sua complementaridade através do uso de uma função de pontuação (PINZI e RASTELLI, 2019).

Deste modo, um algoritmo do *docking* é dividido em duas etapas distintas, a fase de pose e a fase de pontuação, onde primeiramente, usa um algoritmo de busca para encontrar o melhor posicionamento do ligante na macromolécula, com base na energia de estabilização do complexo ligante-alvo, bem como realização de cálculo de desvio entre as melhores poses obtidas (“Root Mean Square Deviation”, RMSD), posteriormente aplica-se uma função de classificação (*score function*), na qual baseia-se no campo de força para determinação da energia de estabilização. Este campo de força compreende termos que estimam interações eletrostáticas (Coulômbicas), interações de Van der Waals (Potencial Lennard-Jones), termos entrópicos, torcionais, envolvidos nas interações (KITCHEN et al., 2004).

Para realização de um cálculo de *docking*, o primeiro passo é obter a estrutura alvo, que comumente consiste em uma grande molécula biológica (proteína, DNA ou RNA). As estruturas dessas macromoléculas podem ser prontamente recuperadas do

Protein Data Bank (PDB), site que fornece acesso às coordenadas atômicas 3D obtidas por métodos experimentais. Quando a estrutura experimental 3D do alvo não estiver disponível podem ser utilizados métodos computacionais de predição, como modelagem comparativa e *ab initio*, obtendo a estrutura tridimensional de proteínas (TORRES et al., 2019; SIVAKUMAR et al., 2020).

Os primeiros métodos de acoplamento relatados basearam-se na teoria de chave proposta por *Fischer*, afirmando que tanto o ligante quanto o receptor podem ser tratados como corpos rígidos e sua afinidade é diretamente proporcional a um ajuste geométrico entre suas formas. No entanto, as proteínas são intrinsecamente dinâmicas e, na maioria das vezes, há uma adaptação mútua na ligação, a fim de maximizar os contatos favoráveis, a flexibilidade do alvo macromolecular não deve negligenciada e lidar apenas com a conformação rígida (GIOIA et al., 2017; PAGADALA et al., 2017).

Os programas de encaixe disponíveis são classificados considerando seus algoritmos de busca, que são definidos por um conjunto de regras e parâmetros aplicados para prever as conformações de um complexo binário. Cada programa apresenta um algoritmo de busca específico (Construção incremental, Algoritmo Genético, Monte Carlo) ou uma associação deles. Suas principais estratégias de flexibilidade no acoplamento das proteínas ao ligante, o método rígido tanto para o ligante quanto a proteína, onde são considerados durante a amostragem apenas três graus de liberdade translacionais e três rotacionais. Sendo usualmente utilizado para acoplamentos proteína-proteína devido sua similaridade com o modelo "chave-fechadura".

No *docking* semiflexível em apenas uma das moléculas, o ligante, é flexível, enquanto a proteína é rígida, assim são amostrados os graus de liberdade conformacionais, translacionais e rotacionais do ligante. Esses métodos assumem que uma conformação fixa de uma proteína pode corresponder àquela capaz de reconhecer os ligantes a serem encaixados. E por fim, a metodologia flexível onde considera tanto ligantes como proteínas flexíveis (SALMASO e MORO, 2018).

Durante a fase de posicionamento, os algoritmos de buscam explorar o cenário de energia livre para encontrar as melhores poses do ligante que são posteriormente classificadas por funções de pontuação. Podem-se apresentar segundo metodologias que empregam a flexibilidade do ligante, classificando-as como pesquisas sistemática, estocástica e determinística, ou alguns algoritmos implementam uma abordagem híbrida combinando dois ou todos três dessas estratégias (GIOIA et al., 2017).

Algoritmos sistemáticos exploram todos os graus de liberdade do ligante durante a pesquisa. Os métodos que empregam esta abordagem são subdivididos em exaustivo, construção incremental e conjunto conformacional. Método Exaustivo explora sistematicamente os valores de cada grau de liberdade de forma combinatória do ligante, construção incremental aborda a fragmentação do ligante em fragmentos menores, seguido pela seleção e encaixe de um fragmento do receptor e, por fim, o conjunto conformacional soluciona problema de combinatória enfrentado por essas abordagens (GUEDES et al., 2013).

Métodos estocásticos e deterministas analisam, respectivamente, todos os graus de liberdade (translacional, rotacional e conformacional) do ligante em cada passo, gerando uma grande diversidade de poses, através de critério probabilístico e obtém o estado real do sistema, através das modificações a serem feitas, levando em consideração o seu próximo estado energético (GUEDES et al., 2013).

Funções de pontuação são capazes de avaliar a afinidade de ligação intermolecular ou energia livre de ligação a fim de otimizar e classificar os resultados, obtendo a melhor orientação após o procedimento de *docking*. Como o componente mais importante do acoplamento molecular, as funções de pontuação apresentam três funções principais: a primeira é determinar o modo e o local de ligação de um ligante à proteína; a segunda é prever a afinidade de ligação absoluta entre a proteína e o ligante na otimização; a terceira é a triagem virtual, onde é possível identificar as melhores drogas para um determinado alvo macromolecular pesquisando através de banco de dados de ligantes (GIOIA et al., 2017; LI et al., 2019).

Existem muitos métodos disponíveis para estimar a afinidade de ligação entre uma proteína e um ligante a partir de uma determinada estrutura 3D de um determinado complexo binário. Usando como entrada as coordenadas atômicas de um complexo binário, através de uma grande variedade de técnicas, funções de pontuação são capazes de estimar a energia livre de ligação ou constante de ligação. A energia livre de ligação é obtida com a equação de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (2)}$$

Onde ΔG é a energia livre de ligação, ΔH é a entalpia, T é a temperatura em Kelvin e ΔS a entropia. A baixa energia de ligação do complexo de proteínas ligantes

indicam a alta estabilidade do complexo, o que significa que o tempo de contato do ligante com o receptor é mais nessa posição particular (GUPTA et al., 2018).

Normalmente, as funções de pontuação são capazes de identificar os vários modos de ligação alternativos e discriminar entre ligantes e não ligantes por meio da otimização local e fazer uma classificação final de todas as poses de ligação do ligante. As funções de pontuação são principalmente classificadas em três tipos, campo de força, empíricas e baseadas em conhecimento. Essas três funções clássicas de pontuação são classificadas de acordo com os tipos de itens dos recursos e usam principalmente o método de regressão linear (LI et al., 2019; SIVAKUMAR et al., 2020). Vários softwares foram desenvolvidos nas últimas décadas para cálculos de *docking molecular*, entre os quais estão alguns exemplos bem conhecidos, como AutoDock, AutoDock Vina, DockThor, GOLD, FlexX e Molegro Docker virtual (TORRES et al., 2019).

Funções de pontuação baseadas em campo de força é um conceito típico da mecânica molecular que aproxima a energia potencial de um sistema com uma combinação de componentes ligados (intramoleculares) e não-ligados (intermoleculares). Entre os componentes intermoleculares incluem o termo de van der Waals, descrito pelo potencial de Lennard-Jones, e o potencial eletrostático, descrito pela função de Coulomb, em que um dielétrico dependente da distância pode ser introduzido para imitar o efeito do solvente. No entanto, termos adicionais foram adicionados às funções de pontuação do campo de força, como os termos de solvatação. A ideia central de usar campos de força na mecânica molecular clássica é estimar a energia potencial de um sistema molecular com base em conformadores de menor energia. Os componentes não ligados são considerados, com a adição dos termos ligados ao ligante, especialmente os componentes de torção. Exemplos de programas com funções de pontuação baseadas no campo de força são GoldScore e AutoDock (SALMASO e MORO, 2018).

Funções empíricas de pontuação usam equações que baseiam-se nas características físicas dos complexos ligante-receptor disponíveis. São sistemas relativamente simples e requer menos tempo computacional do que as funções de pontuação baseadas em campos de força. Nessa função ocorre o somatório de várias energias, por exemplo, van der Waals, eletrostática, hidrofobicidade, de solvatação, ligações de hidrogênio e entropia. Em um primeiro momento ocorre a otimização e, em seguida após ajustar os dados de afinidade de ligação entre o complexo proteína-ligante, os mesmos são interpretados por ajuste de mínimos quadrados. A função de pontuação

LUDI foi o primeiro exemplo de uma função empírica. Outras funções de pontuação empíricas são GlideScore e ChemScore (SIVAKUMAR et al., 2020).

As funções de pontuação baseadas em conhecimento tem como princípios potenciais estatísticos pares de átomos conhecidos que podem ser usados para obter interações favoráveis entre um ligante e uma proteína com estruturas tridimensionais disponíveis. Através do método *pseudo-cálculo* esses dados de átomos em pares são transformados utilizando potencial de força média que descreve a energia livre de interação entre átomos de proteína-ligante em pares. Dada a pontuação da postura, as frequências dos contatos do par de átomos proteína-ligante podem ser calculadas a partir dos componentes de energia usados para acessar a postura (SIVAKUMAR et al., 2020).

No entanto, as pesquisas atuais melhoraram bastante os estudos para as funções de pontuação, especialmente envolvendo as interações proteína-ligante. Um quarto tipo de função de pontuação incorpora o método de aprendizado de máquina com regressão não linear baseando-se em na combinação de pontos fortes dos métodos de impressão digital com mecânica quântica. Outras abordagens incluem uma combinação de múltiplas funções de pontuação, chamadas de pontuação de consenso (LI et al., 2019; SIVAKUMAR et al., 2020).

Na segunda fase, a função de score elege os melhores modos de ligação, aqueles que são mais próximos dos obtidos experimentalmente. Estas funções de score são obtidas de acordo com os campos de força de mecânica molecular e parâmetros empíricos de cálculos de energia livre. Durante a formação do complexo receptor-ligante, há mudanças nos graus de rotação, translação e conformacional liberdade, gerando grandes combinações de modos possíveis de ligação entre as duas moléculas. Portanto, essas simulações combinam e calculam todos os pares possíveis de conformações computacionalmente (SILVA, 2018).

3.3 TERPERNOS

Composto terpenóides, presente nos óleos essenciais (OE), são substâncias cuja atividade farmacológica está relacionada a capacidade dos mesmos de cruzar a barreira hematoencefálica e modular a função cerebral. Tendo como característica importante sua atividade anestésica devido sua alta lipossolubilidade contribuindo para a rápida difusão através membranas biológicas (BIANCHINI et al., 2017). São uma classe de metabólitos secundários de plantas, substâncias cuja origem biossintética deriva de

unidades do isopreno, com estruturas e funções distintas, e são considerados importantes agentes no uso medicinal de plantas aromáticas (PAJARO-CASTRO et al., 2017; PASSOS et al., 2009).

Monoterpenos, um grupo estruturalmente diverso de compostos fitoquímicos, são os principais constituintes dos OE. Recentemente, estudos demonstraram que essas moléculas, de ocorrência natural, podem modular as propriedades funcionais (PAJARO-CASTRO et al 2017). Além dos monoterpenos, os OE apresentam em menores quantidades os sesquiterpenos. Estes exibem diversas atividades biológicas, incluindo hepatoprotetora e ações antitumorais (FONSECA et al., 2016), além de ter demonstrado atividades sobre o SNC, incluindo atividade sedativa, antinociceptiva, antidepressiva e anticonvulsivante (PASSOS et al., 2009).

Alguns estudos sobre modos de ação de alguns monoterpenóides revelam que estes apresentam vários alvos proteicos possíveis no sistema nervoso, incluindo receptores ionotrópico ácido γ -aminobutírico (GABA), receptores de octopamina, tiramina, acetilcolinesterase (AChE) e receptores nicotínico da acetilcolina (nAChR). Entre esses alvos, o receptor GABA ativado pelos monoterpenóides desenvolvem uma resposta rápida ao sistema nervoso central e periférico devido sua interferência no influxo de cloreto (TONG e COATS, 2012).

A nível molecular, os monoterpenos modulam alostericamente os receptores GABAA. A maior modulação potencial positiva provém de monoterpenos bicíclicos e/ou portadores de grupos hidroxila, como publicados em estudos que mostraram o linalol, mirtenol e verbenol intensificando correntes GABAérgicas de 2 a 7 vezes. Essa interação é hipotetizada por ocorrer acoplamento direto com os domínios transmembranares do receptor embutido na bicamada lipídica hidrofóbica das células neuronais e, portanto, acessível pelo monoterpeno altamente lipofílico (MILANOS et al., 2017).

Vários estudos destacam a atividade GABAérgica dos monoterpenos como por exemplo, Wang e Heinbockel (2018) avaliaram a atividade antinociceptiva do nerolidol usando o teste de contorções induzidas por ácido acético, o teste da formalina e o teste da placa quente. Os resultados mostraram que o nerolidol apresentou atividades antinociceptivas em modelos de nocicepção química (teste de contorções induzidas por ácido e teste de formalina), mas não no modelo de nocicepção térmica (placa de aquecimento teste). A atividade analgésica do nerolidol está possivelmente relacionada ao neurotransmissor GABA-A.

Estudos com os monoterpênóides timol, carvacrol e seus isômeros, demonstram atividade anticonvulsivante em camundongos, mediada por receptor GABA (ácido g-aminobutírico), o principal neurotransmissor inibitório no cérebro. Pesquisas mostraram, segundo Mishra e Baker (2014), que o carvacrol pode aumentar a latência da convulsão no choque máximo (MES) em modelos de camundongos com pentilenotetrazole (scPTZ ou scMET). Em altas doses (> 100 mg / kg) fornece proteção incompleta sugerindo que não é um anticonvulsivante altamente eficaz. Recentemente, foi relatado que o timol aumenta as latências para convulsões no MES agudo (eletrochoque máximo) e em modelos de animais com scMET.

Relacionam essa atividade depressora do SNC do timol e carvacrol devido às suas similaridades ao mecanismo de ação do anestésicos Propofol. Este, apresenta atividade comprovada em peixes, é um agonista GABA-A amplamente utilizado para induzir anestesia em medicina humana e veterinária (BIANCHINI et al., 2017). Além de causar anestesia, o Propofol exerce propriedades anticonvulsivantes em subdoses anestésicas. O propofol está emergindo como uma terapia preferida para evitar convulsões no estado epiléptico humano (MISHRA e BAKER, 2014).

Ademais, estudos farmacológicos indicam também as cetonas monoterpênicas carvona e tujona (tanto enantiômeros como mistura de isômeros α e β), ativando GABA- A_R , utilizando como base receptores funcionais dos neurônios corticais que são ativados pelos benzodiazepínicos. Bem como estudos demonstram o mirtenol como bom potente modificador do receptor GABA-A, cujos aumentos significativos das correntes pelo GABA podem ser observadas em concentrações mais baixas de mirtenol. Essa ativação do receptor GABA proporciona, entre outras atividades, gastroproteção e propriedade ansiolítica mediada por mecanismo GABAérgico (VIANA et al., 2016).

Por fim, outro monoterpênóide de grande interesse, o linalol, precursor do tetrahidrolinalol e nerolidol, apresenta potencial atividade anestésica (BIANCHINI et al., 2017). Estudos farmacológicos com o mesmo demonstraram seu amplo espectro de ação em modelos experimentais de epilepsia, protegendo contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol, picrotoxina e eletrochoques em camundongos (PASSOS et al., 2009).

4.0 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO E LOCAL DA PESQUISA

Estudo quali-quantitativo realizado no Laboratório de Química Farmacêutica e Físico-Química, vinculado ao Colegiado de Farmácia, na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, em parceria com o grupo de Farmacologia do colegiado de Medicina do campus Paulo Afonso-BA da UNIVASF, na pessoa do Prof. Dr. Diogo Fonseca.

4.2 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO ALVO MACROMOLECULAR

Considerando a hipótese de interação dos terpenos estudados neste trabalho com o receptor GABA-A, foi obtido no banco de dados on-line RSCB PDB (*Protein Data Bank*) um canal iônico controlado por ligante (GLIC), semelhante à estrutura do GABA-A_R, cuja conveniência se deu por estar complexado com o agonista Propofol. Isto confirma ainda um dos possíveis mecanismos de ação do propofol, até então considerado “estruturalmente inespecífico” a nível molecular. A região de ligação deste anestésico se configurou como a melhor hipótese para o estudo dos mecanismos de ação moleculares dos terpenos tetraidrolinalol (THL), mirtenol (MT) nerolidol (NL), via *docking*, baseado na similaridade estrutural e físico-química desses monoterpênicos com o Propofol, bem como em publicações que descrevem a modulação do GABA-A_R por diversos terpenos, dentre eles o Linalol, análogo estrutural das moléculas foco do estudo.

O alvo macromolecular pLGIC, correspondente a estrutura cristalográfica de raio-X de um canal iônico pentamérico ligado ao propofol foi obtido no RCSB *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org>) (BERMAN et al., 2000), sob o código PDBID: 3P50 (NURY et al., 2011). Após a realização deste trabalho, verificamos a estrutura cristalográfica do próprio, receptor GABA-A_R expresso no banco de dados. Assim, para garantir a efetividade do método, uma validação foi realizada com objetivo de checar a capacidade da macromolécula 3P50 (pLGIC) em reproduzir a geometria do receptor GABA-A. Usando o programa Chimera, na função “*matchmaker*”, avaliou-se o RMSD entre o canal pentamérico 3P50 e o receptor GABA-A expresso com mesma sequência proteica de humanos (código 3X3Z).

4.3 OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS LIGANTES E OTIMIZAÇÃO DE GEOMETRIA

Neste trabalho foram analisados vinte e cinco monoterpênicos (Tabela 1), 03 destes com atividades sendo estudadas pelo grupo colaborador de farmacologia experimental (THL, NL, MT), as devidas estruturas foram desenhadas considerando todos as configurações possíveis dos centros estereogênicos, totalizando ao final trinta e seis moléculas. Nesta etapa usamos o programa ACD/ChemSketch®. Após a construção inicial, as mesmas foram submetidas à uma otimização de geometria através do método semi-empírico RM1, utilizando o pacote HyperChem® (ROCHA et al., 2006).

4.4 DOCKING MOLECULAR DOS MONOTERPÊNICOS COM A MACROMOLÉCULA 3P50

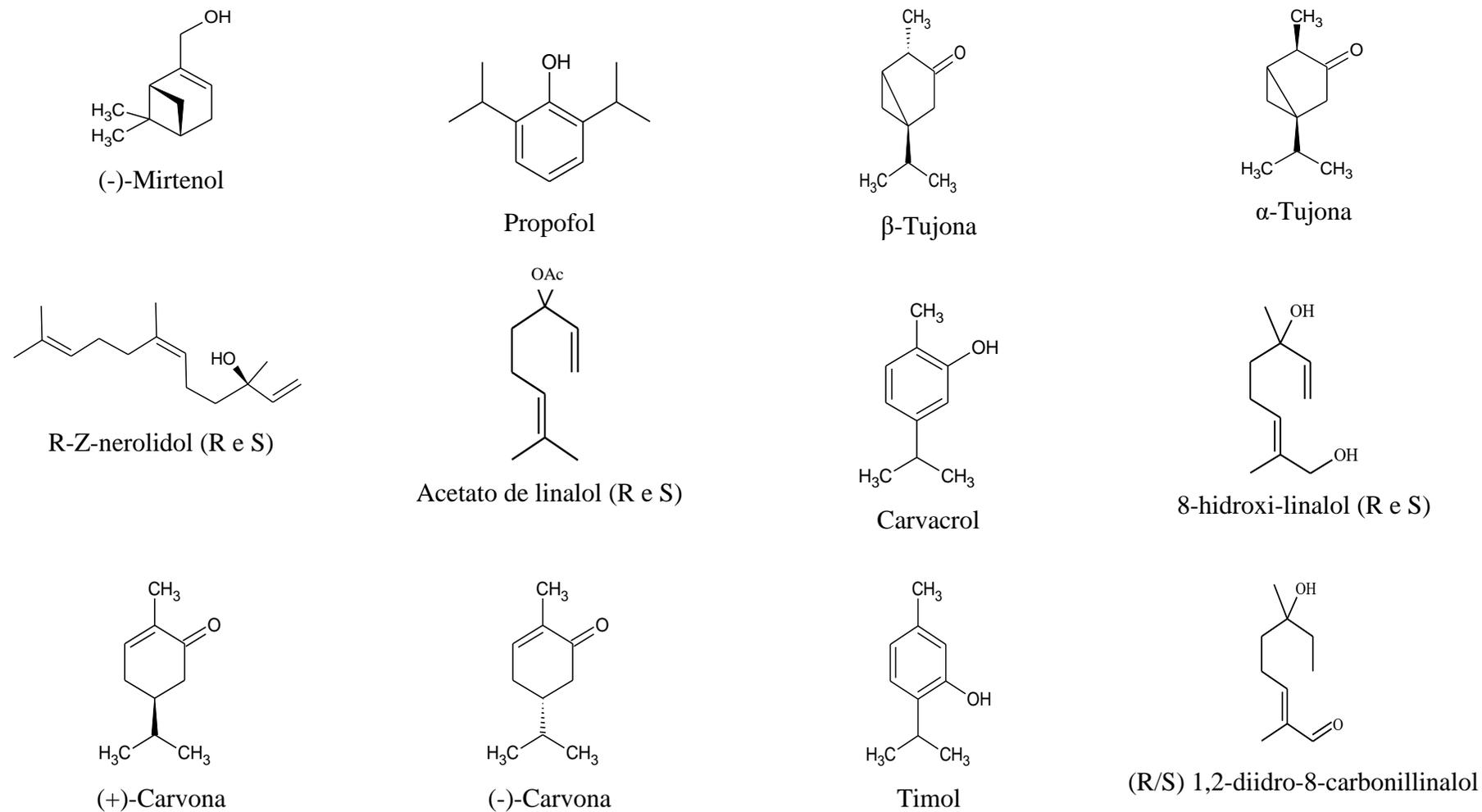
O estudo de *docking molecular* foi realizado utilizando o programa AutoDock Vina (TROTT e OLSON, 2010; MORRIS et al., 1998) e a interface gráfica Autodock Tools (ADT) (MORRIS et al., 1998) para geração de *inputs* e visualização de *outputs*. No ADT foram adicionadas cargas Gasteiger (necessárias ao cálculo dos potenciais clássicos), bem como hidrogênios polares (ausentes em estruturas cristalográficas).

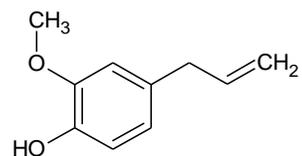
Um procedimento de *redocking* foi realizado utilizando a estrutura cristalográfica complexada com o Propofol, em uma grade com dimensões de 14 x 14 x 14 Å e espaçamento interno de 1,0 Å (padrão Vina). Este procedimento objetivou determinar os melhores parâmetros do algoritmo para realização dos cálculos com os monoterpênicos, (MORRIS et al., 1998). Os potenciais são calculados segundo definições do programa, seguindo os tipos de átomos do ligante para mapeamento das energias de interação específicas. O grau de confiabilidade do procedimento foi avaliado com base no RMSD (“Root Mean Square Deviation”, ou Raiz Quadrada do Desvio Médio ao Quadrado), relativo às coordenadas tridimensionais dos átomos do ligante cristalográfico propofol. O ligante foi mantido flexível e o receptor rígido nas simulações.

Posteriormente, os mesmos parâmetros usados para encaixes do tetraidrolinalol (THL), mirtenol (MT) nerolidol (NL), no alvo macromolecular 3P50 (pLGIC), serviram de padrão para as demais moléculas estruturalmente associadas e de

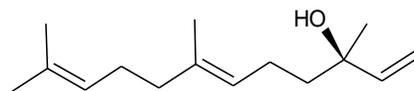
conhecida modulação positiva e negativa. As poses, perfis de interação e energias obtidos foram analisados à luz dos dados farmacológicos experimentais.

Tabela 1- Construção das estruturas dos monoterpenos com as possíveis configurações dos centros estereogênicos, Petrolina 2021.

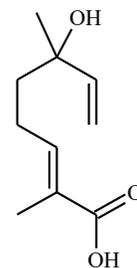




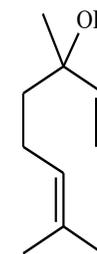
Eugenol



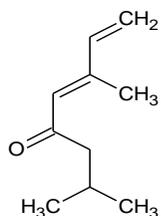
E-nerolidol (R e S)



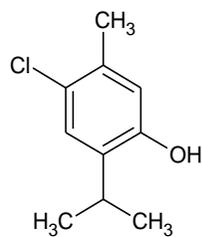
8-carboxil-linalol (R e S)



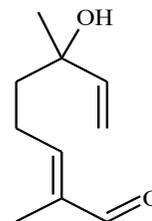
Linalol (R e S)



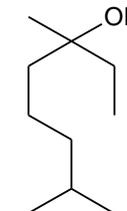
Tagetona



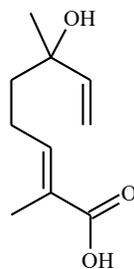
Clorotimol



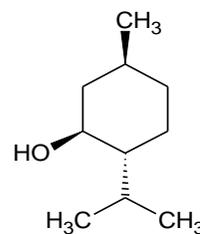
8-carbonil-linalol (R e S)



Tetrahidrolinalol (R e S)



8-carboxil-linalol (R e S)



(+)-Mentol

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

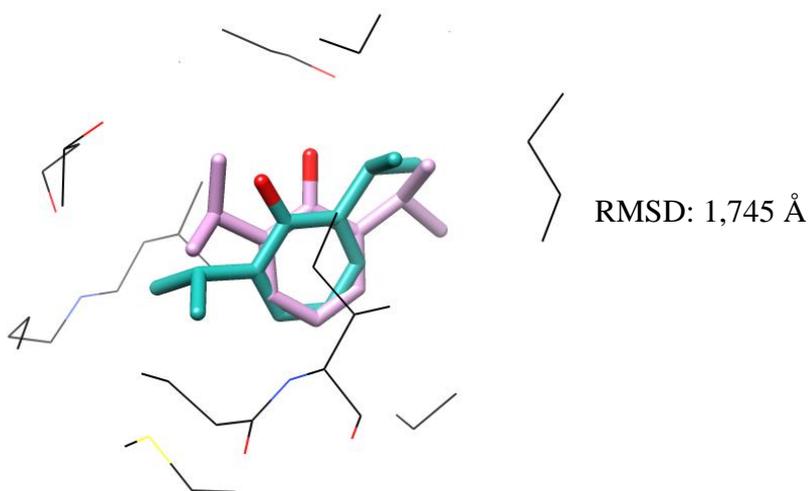
5.1 DOCKING MOLECULAR DOS MONOTERPENOS COM A MACROMOLÉCULA 3P50

Inicialmente, cabe destacar que um estudo de Nogueira et al., (2016), revelou que monoterpenos modulam alostericamente os receptores de ácido gama-amino butírico (GABA- A_R) e revertem os efeitos epilépticos induzidos em camundongos. Isto corrobora as investigações propostas neste trabalho envolvendo os dados experimentais e presente modelagem de THL, NL, MT.

Assim, o alvo macromolecular escolhido (pLGIC código 3P50), complexado originalmente ao propofol foi submetido à cálculos de acoplamento molecular para THL, NL e MT, bem como, para terpenos estruturalmente relacionados que demonstram atuar no GABA- A_R , seja modulando positivamente (linalol e seus derivados, carvacrol, timol, eugenol, (+)-mentol, tagetona, clorotimol) ou negativamente ((+) e (-) carvona, tujona).

O *redocking* do Propofol foi realizado no sítio de ligação da proteína (Figura 3) obtendo-se um RMSD de 1,745 Å. Isto valida o procedimento, considerando que o valor máximo preconizado na literatura para um *docking* comparável a dados cristalográficos é 2,0 Å (SILVA, 2015).

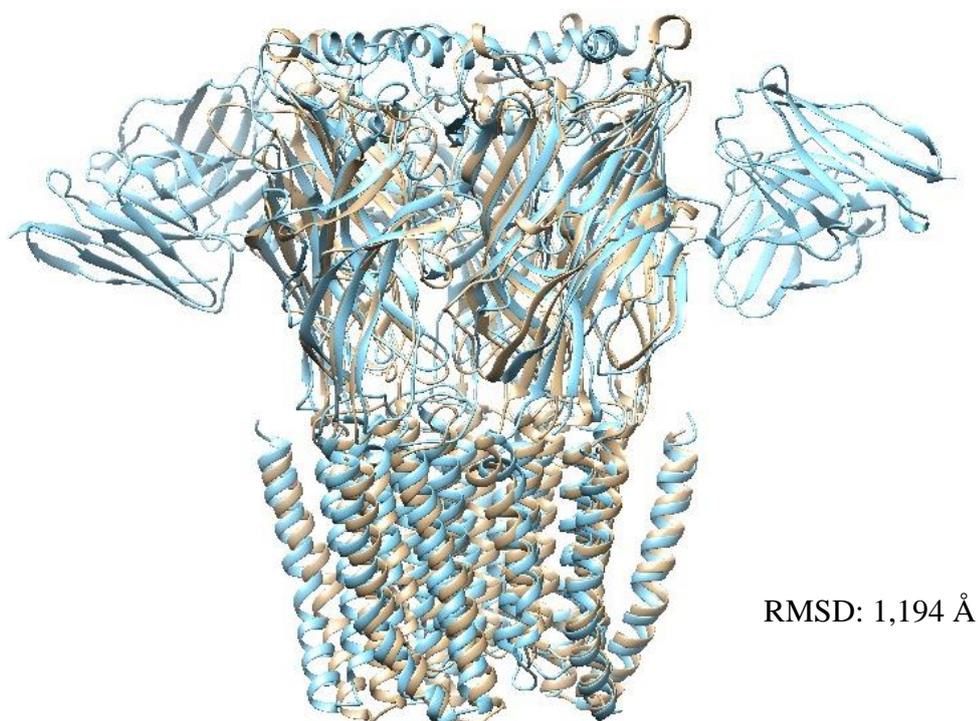
Figura 3 - *Redocking* do Propofol, Petrolina 2021.



Fonte: autoria própria, 2021. Propofol cristalográfico (lilás) e ligante otimizado (azul).

A comparação da geometria do receptor GABA-A de humanos (3X3Z) com a proteína 3P50 forneceu um valor de RMSD 1,194 Å, indicando ótima concordância entre as duas macromoléculas e, conseqüentemente, a proteína utilizada neste trabalho representa com sucesso o GABA-A_R (Figura 4).

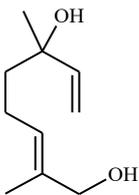
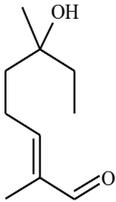
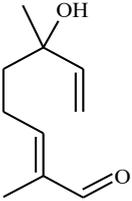
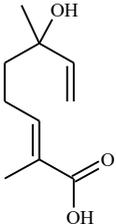
Figura 4 - RMSD entre o homólogo bacteriano pLGIC (3P50) e o GABA-A_R com mesma seqüência proteica de humanos (3X3Z), Petrolina 2021.

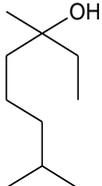


Fonte: autoria própria, 2021. Legenda: Proteínas 3P50 (ciano) e 3X3Z (azul).

Os cálculos iniciais de *docking* molecular foram realizados para o Tetraidrolinalol (THL), seus análogos com modulação conhecida (Linalol, 8-hidroxi-linalol, 1,2-diidro-8-carbonil-linalol, 8-carbonil-linalol, 8-carboxil-linalol) e o propofol (PFL). Obteve-se nove melhores energia de ligação para cada molécula. Após a análise dos resultados, observou-se que a melhor energia de ligação para THL, foi de -5,6 (Tabela 2), não havendo qualquer diferença valor de energias entre os entiomeros R/S do THL no sítio de interação do propofol.

Tabela 2 - Valores de energias de ligação entre o tetrahidrolinalol e análogos com o receptor GABA-A complexado ao Propofol (3P50), Petrolina 2021.

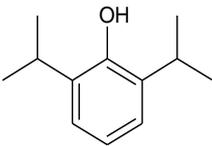
Moléculas	Estrutura	Configurações com menores energias (3P50)	
		R	S
Linalol		-5,9	-5,9
8-hidroxi-linalol		-5,4	-5,5
1,2-diidro-8-carbonil-linalol		-5,6	-5,7
8-carbonil-linalol		-5,6	-5,7
8-carboxil-linalol		-5,8	-5,9

Tetrahidrolinalol		-5,6	-5,6
-------------------	---	------	------

Fonte: autoria própria, 2021.

O ligante propofol, cuja obtenção de estrutura cristalográfica complexada com homólogo do GABA-A_R indica um dos possíveis mecanismos de ação deste anestésico geral, apresenta energia de ligação para a melhor pose em seu sítio nativo de -6,6 Kcal/mol, mostrando-se mais estável do que os dois enantiômeros de THL (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de energias de ligação do Propofol com a macromolécula 3P50, Petrolina 2021.

Moléculas	Estrutura	Menores energias (3P50)
Propofol		-6,6

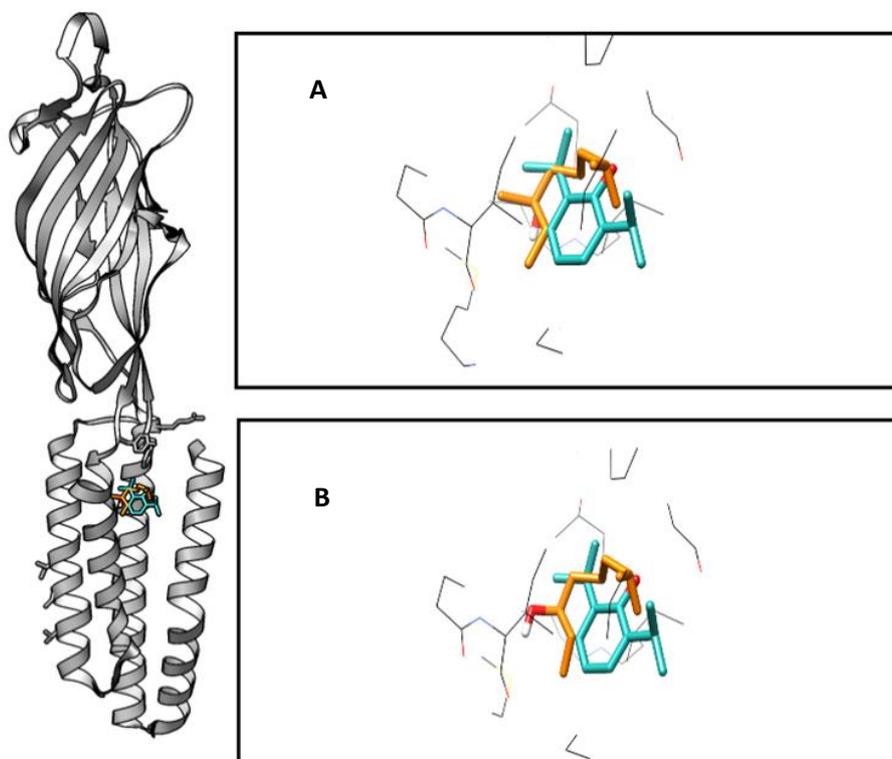
Fonte: autoria própria, 2021.

O THL provém da redução do Linalol, terpeno com atividade sedativa e ansiolítica, e pode estar modulando os receptores GABA_A devido suas similaridade físico-química (lipofilicidade) e estrutural (tamanho e tipos de átomos) ao Propofol (APROTOSOAIÉ et., al). Com o depósito do trabalho de Nury et al., foi possível identificar e discutir que a parte superior da região transmembranar do canal pentamérico é o domínio responsável pelas atividades anestésicas e sedativas do PF.

Estruturadamente, o tetraidrolinalol conserva hidroxila (-OH) em C3 em relação ao seu precursor linalol (conhecido na literatura como modulador GABA-A_R). Não apresenta -OH em C8 e nenhum outro grupo funcional polar, características essas

favoráveis à interação na região transmembranar (lipofílica) do GABA-A_R (Figura 5) (ELSHARIF et al., 2015).

Figura 5 - Melhores poses de encaixe para os enantiómeros S e R do Tetraidrolinalol comparando com os nativos Propofol, Petrolina 2021.

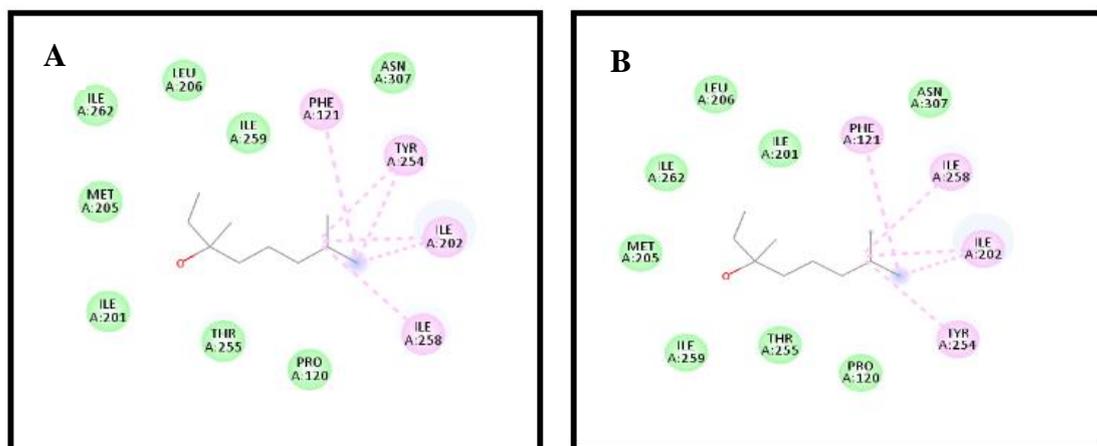


Fonte: autoria própria, 2021. Legenda: Tetraidrolinalol (laranja) na configuração S (A) e R (B) no sítio do Propofol (ciano).

Os terpenóides são compostos geralmente bastante hidrofóbicos com baixos pesos moleculares (WANG e HEINBOCKEL, 2018). Laverty et al., (2017) confirmam o achado, ao afirmar que um grupo hidroxila no ligante forma uma ligação de hidrogênio com o grupo amino principal, essa interação estabiliza o acoplamento ao domínio.

Seguindo nesse contexto, observa-se que o ambiente de interação do GABA-A_R com o tetraidrolinalol é rodeado pelos aminoácidos isoleucina (ILE), tirosina (TYR) e fenilalanina (PHE) (Figura 6), os quais também estão presentes no ambiente de interação do propofol, com proteína a alvo 3P50. Isto é justificável observando a natureza hidrofóbica da cavidade e com predominância de resíduos hidrofóbicos próximos.

Figura 6 - Ambiente de interação do Tetraidrolinalol R (A) e S (B) no sítio nativo Propofol, Petrolina 2021.



Fonte: autoria própria, 2021.

Legenda: Tirosina (TYR); Treonina (THR); Isoleucina (ILE) Metionina (MET); Fenilalanina (PHE); Asparagina (ASN); Leucina (LEU), Prolina (PRO).

Mutações de alguns aminoácidos que revestem o local de ligação alteram substancialmente a resposta iônica do canal pentamérico (pLGIC) aos prótons e afetam sua farmacologia anestésica geral (NURY et al, 2011). Além disso, esse resíduo de aminoácidos apresentam papéis cruciais para a provável estabilização um estado aberto, influxo de Cl^- , do GABA- A_R . Qualquer interrupção dessas interações por mutação de resíduos nas subunidades causa epilepsias familiares (LAVERTY et al., 2017).

Como verificado na Tabela 4, o THL e análogos apresentam ambiente de interação no sítio nativo do Propofol com vários aminoácidos, entre eles a Tirosina. Segundo Chiodi et al., (2018) a presença tirosina (TYR), é encontrada em todas as subunidades GABA- A_R . A mesma impede o bloqueio do efeito inibitório do neurotransmissor GABA nos receptores homoméricos.

Tabela 4 - Ambiente de interação do Tetraidrolinalol e análogos no sitio nativo do Propofol, Petrolina 2021.

Molécula	Aminoácidos
1. R linalol	PHE TYR ILE ASN LEU MET THR
2. S linalol	PHE TYR ILE ASN LEU MET THR
3. R 8-hidroxi-linalol	ILE PHE TYR ASN LEU MET THR
4. S 8-hidroxi-linalol	VAL ILE THR ASN TYR PHE LEU MET
5. 1,2-diidro-8-carbonil-linalol	ASN ILE LEU MET VAL THR TYR PHE
6. S 1,2-diidro-8-carbonil-linalol	TYR ILE PRO THR MET ASN PHE LEU
7. R 8-carbonil-linalol	TYR THR ILE MET PHE ASN TYR LEU PRO
8. S 8-carbonil-linalol	ASN ILE LEU MET THR TYR PHE
9. R 8-carboxil-linalol	ILE PHE TYR ASN LEU MET
10. S 8-carboxil-linalol	ILE THR ASN TYR PHE LEU MET
11. R Tetraidrolinalol	ILE LEU PHE ASN TYR PRO THR MET
12. S Tetraidrolinalol	ILE LEU PHE ASN TYR PRO THR MET

Fonte: autoria própria, 2021.

Legenda: Tirosina (TYR); Treonina (THR); Isoleucina (ILE) Metionina (MET); Fenilalanina (PHE); Asparagina (ASN); Leucina (LEU), Prolina (PRO).

Estudos indicam que a substituição conservadora de TYR pela PHE inibe o bloqueio desencadeado pelo propofol e faz com que o GABA apresente atividade inibitória em altas concentrações. Analisando, o THL e seus analogos o ambiente de interação de todas as moléculas encontra-se tanto Phe como TYR, influenciando a interação hidrofóbica ao receptor e consequentemente potência e eficácia dos ligantes.

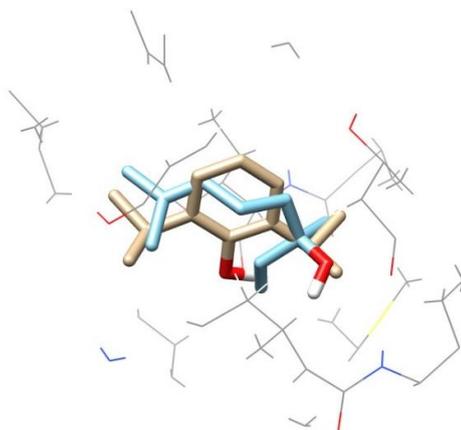
Alem desses fatores interacionais, estruturalmente o THL difere por não apresentar duplas ligações ao longo da sua estrutura. Essa ausência de insaturações permite uma melhor liberdade conformacional à molécula. A versatilidade da orientação da hidroxila nas configurações R e S poderia estar relacionada à perda e formação de diferentes pontos de interação farmacofórica, a partir das diferentes configurações. No entanto, não observamos diferenças significativas nas energias entre eles. Comparando dados energéticos e geométricos, podemos perceber que os dois enantiômeros THL

podem interagir de maneira versátil, considerando as posições do OH. A cadeia de carbono do THL ocupa locais semelhantes ao ligante padrão PFL, mas interage com menos eficiência.

Na análise experimental do grupo colaborador em Farmacologia Experimental, situado no colegiado de Medicina do campus Paulo Afonso-BA (descrito no item 4.1 da metodologia), o THL aumentou a latência para crises tônico-clônicas, além de reduzir a duração das crises generalizadas nos animais tratados (ratos machos), o que sugere seu potencial em modular o sistema GABAérgico. Corroborando esses resultados, a análise de *docking molecular* mostra o THL como ligante possível do sistema GABAérgico, com resultados de energia de estabilização inferiores porém comparáveis ao ligante padrão PFL. Após correlação de dados experimentais e *in silico* o artigo encontra-se em fase de publicação.

Comparando os dados de modelagem do THL com seus análogos, o seu precursor molecular direto Linalol (3,7-dimetil-1,6-octadieno-3-ol) obteve melhores energias para seus enantiômeros R/S (ambos -5,9). Este resultado, confrontado com propofol e THL (Figura 7), evidencia menor e maior estabilidade relativa, respectivamente. A boa afinidade do Linalol ao GABA-A_R já é descrita no estudo Milanos et al., (2017), o qual classifica o Linalol como potencializando positivamente o receptor GABAA sendo seu principal contribuinte o grupo C3 da molécula (ELSHARIF et al., 2015).

Figura 7 – Moléculas do propofol (amarelo) e tetraidrolinalol (azul) sobrepostos, Petrolina 2021.



Fonte: autoria própria, 2021.

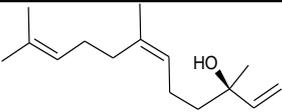
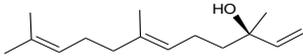
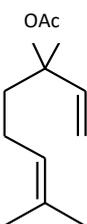
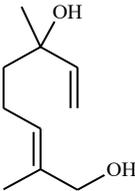
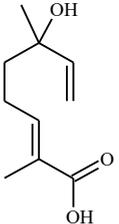
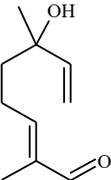
Com relação ao 8-hidroxi-linalol a energia de ligação para a melhor pose foi de -5,5 e para o 8-carboxil-linalol de -5,9, sendo a configuração S mais estável para ambas. É notável que a hidroxilação em C8 da molécula de Linalol, gerando o 8-hidroxi-linalol, mostra desfavorecer a interação com o receptor. Por outro lado, o 8-carboxil-linalol, com carboxilado em C8, obteve interação favorável na macromolécula do estudo com energia de interação comparável.

Milanos et al., (2017) destacam que a presença de grupos hidrofílicos, como a presença de hidroxilas, prejudicam a interação entre o composto e o local de ligação no sítio de natureza lipofílica, a exemplo do receptor GABA-A, corroborando com resultados de acoplamento molecular obtidos. A interação depende das forças de atração intermoleculares de Van der Waals e London, dentre outras. Como a região transmembranar do receptor GABA-A apresenta caráter lipofílico, a adição de hidroxilas em C8 diminui a afinidade com a macromolécula.

Por fim, os compostos 1,2-diidro-8-carbonil-linalol e 8-carbonil-linalol, tanto na configuração R quanto S, obtiveram respostas intermediárias, com pouca variação em seus níveis de energia. Observa-se que estes compostos diferem entre si pela insaturação presente no 8-carbonil-linalol e ausente no 1,2-diidro-8-carbonil-linalol.

Considerando a segunda molécula protagonista deste trabalho, o mesmo procedimento de *docking* foi realizado para o Nerolidol (NL) e nos análogos do linalol com modulação conhecida (Acetato de linalol, 8- hidroxi-linalol, 8-carboxil-linalol, 8-carbonil-linalol), gerando nove melhores energia de ligação para cada um. Nestes cálculos de acoplamento molecular para o Nerolidol as duas formas isoméricas com configuração R (-6,7 Z e -6,8 E) obtiveram energias ligeiramente melhores que o próprio propofol (-6,6) em seu sítio ação. Os enantiômeros S foram similares ao propofol (-6,6) (Tabela 5 e Figura 8). O nerolidol (NL) possui quatro formas isoméricas diferentes que consistem em dois enantiômeros e dois isômeros geométricos (APROTOSOAIE et al., 2013). A existência dessas formas isoméricas é devido a presença de uma ligação dupla na posição C6 e o centro assimétrico na posição C3.

Tabela 5 - Valores de energias de ligação entre o Nerolidol e análogos com o receptor GABA-A complexado ao Propofol (3P50), Petrolina 2021.

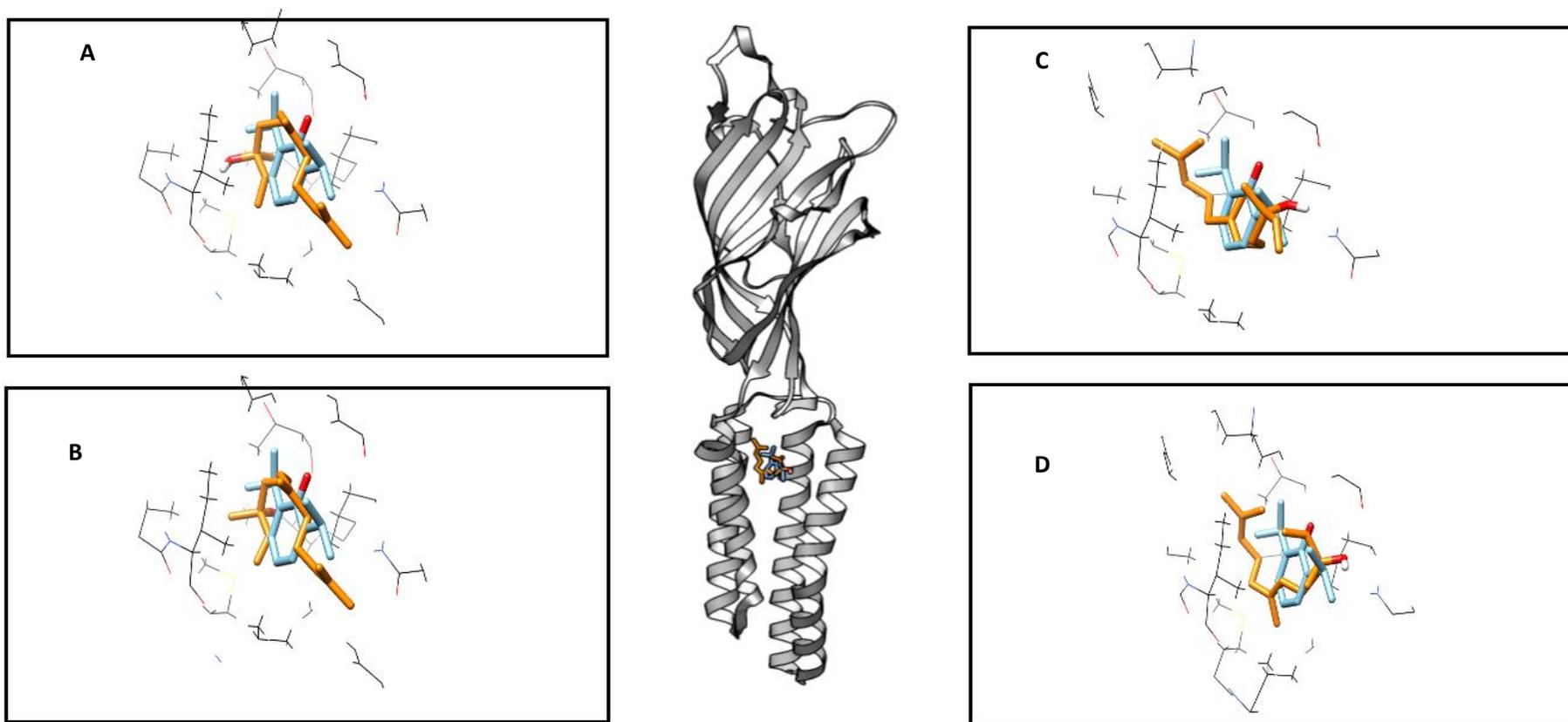
Moléculas	Estrutura	Configurações com menores energias (3P50)	
		R	S
Nerolidol (Z)		-6,7	-6,6
Nerolidol (E)		-6,8	-6,6
Acetato de linalol		-6,1	-6,1
8- hidroxil-linalol		-5,8	-5,9
8-carboxil-linalol		-5,8	-6,2
8-carbonil-linalol		-5,9	-6,1

Fonte: autoria própria, 2021.

Observa-se que o Nerolidol mantém uma hidroxila no grupo C3 o que contribui para a modulação do receptor GABAA, justificando os bons resultados de energia de complexação. Avaliando, estruturalmente, o propofol é um derivado fenólico dissustituído por grupos isopropila nas posições orto à hidroxila fenólica, segundo estudos de QSAR 4D a característica mais importante da ligação do propofol ao receptor GABAA envolve o próton do grupo -OH formando uma ligação de hidrogênio a um grupo aceitador no receptor GABAA (KRASOWSKI et al., 2002).

A similaridade dessas duas moléculas, lipofilicidade e conservação do grupo OH, justificam a efetividade da hipótese metodológica. Levando em consideração estudos de QSAR, autores como Tong e Coats (2011), relatam a importância da interação lipofílica nas interações entre monoterpenóides e o receptor GABA, além disso constatou-se que a presença do átomo de oxigênio nesses terpenos são cruciais para que haja uma interação forte com esse receptor. A diferença de 0,2 Kcal/mol menos estável do Propofol, em comparação ao Nerolidol, pode ser devido a menor liberdade rotacional da molécula do PFP (presença de grupos volumosos e molécula simétrica), enquanto o NL apresenta uma maior disposição rotacional para encaixe no sítio de ligação.

Figura 8 - Melhores poses de encaixe para os enantiômeros S e R do Nerolidol comparando com o nativo Propofol, Petrolina 2021.

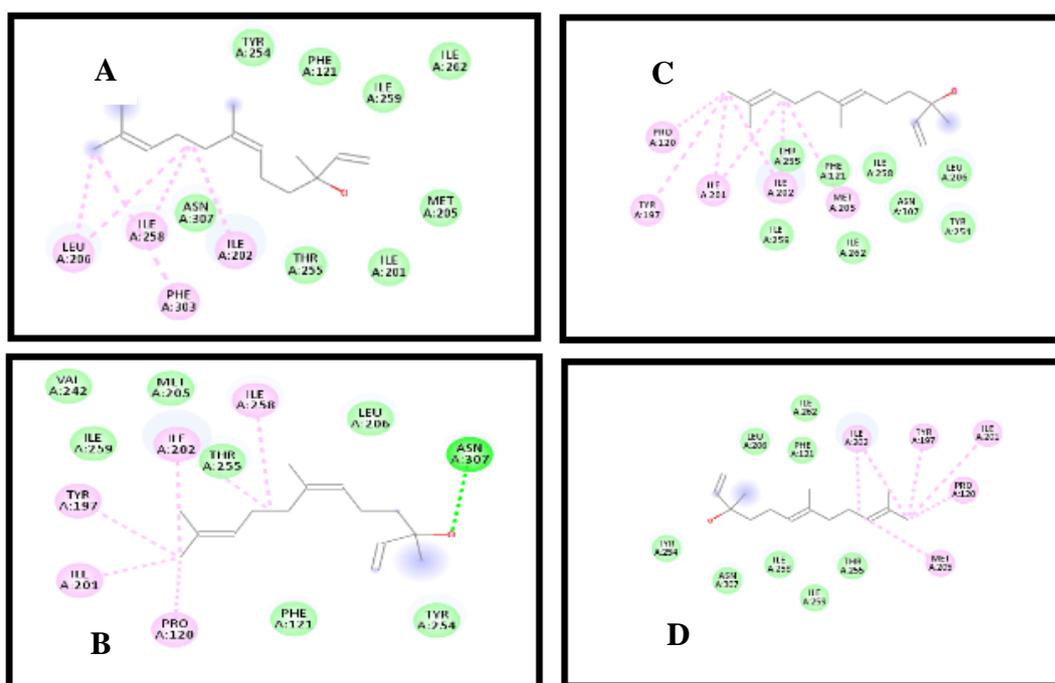


Fonte: autoria própria, 2021. Legenda: Nerolidol Z na configuração S (A) e R (B) e Nerolidol E configuração S (C) e R (D).

Os testes experimentais farmacológicos do Nerolidol já foram publicados por Nogueira et al., (2016) na revista *Fundamental e Clinical Pharmacology*. Os dados demonstraram o Nerolidol diminuindo o tempo de lambertura da pata dos camundongos. Ademais, os resultados mostraram que o pré-tratamento com a bicuculina, antagonista do GABAA, reverteu o efeito antinociceptivo do nerolidol em camundongos, em duas fases de teste com formalina. Esses resultados indicam a atividade antinociceptiva do NL é mediada pelos receptores GABA-A, corroborando com os resultados de acoplamento molecular, onde o nerolidol apresenta boa afinidade à macromolécula em estudo.

Analisando o ambiente de interação do NL, observa-se principalmente ligações com o aminoácido tirosina (TYR), (Figura 9). Segundo autores como Chiodi et al., (2018) a presença de TYR, é crucial para os efeito inibitórios no GABA nos receptores GABAA. As formas isoméricas do NL na configuração R (-6,7 Z e -6,8 E) que apresentaram melhores energias interagem principalmente com a TYR, dentre outros aminoácidos com caráter hidrofóbicos. Além disso, destaca-se a interação da configuração R do Nerolidol Z com ASN, este pode estar relacionado com estabilização dos ligantes a macromolécula.

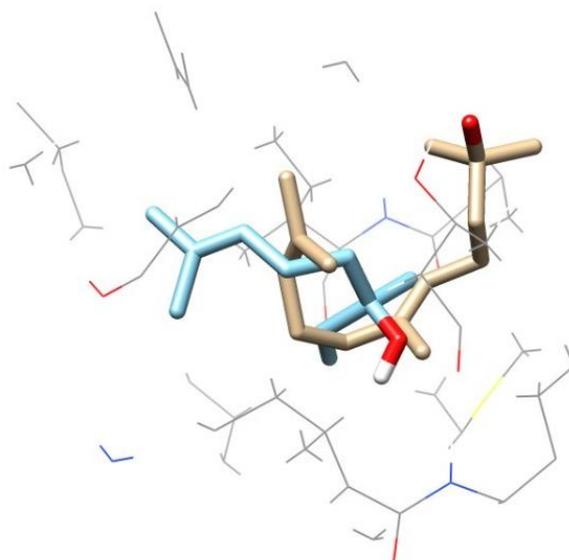
Figura 9 - Ambiente de interação do Nerolidol Z S(A)/R(B) e Nerolidol E S(C)/R(D) no sítio nativo Propofol, Petrolina 2021.



Fonte: autoria própria, 2021.

Fazendo um comparativo entre o Nerolidol e seus análogos, também submetidos ao *docking*, constatou-se que resultados de acoplamento molecular foram melhores para o NL (-6,8) do que para seu precursor, o Linalol (-5,9) (Figura 10). Aquele conserva o grupo C3 da molécula de origem e apresenta maiores quantidades de ligações C-H. Estas ligações são bastante comuns nessas moléculas, são relativamente apolares, uma vez que carbono e hidrogênio apresentam valores muito próximos para eletronegatividade. As forças de dispersão de London que mantêm as moléculas unidas aumentam com o crescimento do tamanho da molécula, o que leva, geralmente a um decréscimo na solubilidade (MARTINS et al., 2013). Sendo assim, as melhores energias do Nerolidol, mais lipofílico, comparado ao Linalol, sugerem uma maior interação, físico-química, na macromolécula alvo usada.

Figura 10 - Moléculas do linalol (azul) e nerolidol (amarelo) sobrepostos, Petrolina 2021.



Fonte: autoria própria, 2021.

Ademais, derivados do linalol são oxigenados em C8 e conservam a hidroxila em C3. O acetato de linalol é um álcool monoterpeneo (modificação do Linalol) substituído por uma porção acetil no átomo C3. Esses compostos acetilados sofrem modificação adicional em C8 gerando compostos como 8- hidroxil-linalol, 8-carboxil-linalol, 8-carbonil-linalol. Para esses derivados do linalol foram obtidas melhores energias de acoplamento molecular do estudo para a configuração S, em ambas as moléculas, sendo o 8-carboxil-linalol com melhor energia (-6,2), 8- hidroxil-linalol com a pior energia (-5,9) e Acetato de linalol com energia intermediária (-6,1).

Esses resultados de acoplamento molecular corroboram com o estudo de Milanos et al., (2017), onde destaca que a acetilação do grupo C3 da molécula resulta em uma diminuição da atividade. Este efeito pode ser compensado por uma modificação adicional do linalol no átomo C8. A Oxidação em C8 resgata a potência enquanto a hidroxilação em C8 não contribuiu positivamente. Com isso, hidroxilação em C8 de acetato de linalol leva a redução de atividades GABAérgica. Podendo ser verificado essa variação de energia na Tabela 4.

Por fim, verifica que o ambiente de interação entre o Nerolidol e seus análogos (Tabela 6) há predominância de resíduos hidrofóbicos garantindo a interação na região transmembranar do receptor GABA-A. Como destaca Lummis et al., (2012), a interação potencial com TYR é essencial para a estabilização do receptor podendo verificar a predominancia desse aminoacido em todos ambientes de interação da moléculas analisadas.

Tabela 6 - Ambiente de interação do Nerolidol e análogos no sitio nativo do Propofol, Petrolina 2021.

Molécula	Aminoácidos
1. R 8 hidroxil acetato linalol	TYR PHE ILE PRO THR LEU ASN
2. S 8 hidroxil acetato linalol	TYR PHE ILE PRO THR LEU ASN ALA
3. R acetato de linalol ILE	ILE THR MET LEU ASN TYR PHE
4. S acetato de linalol	ILE THR MET LEU ASN TYR PHE
5. R 8 carbonil acetato de linalol	PRO THR TYR PHE ILE ASN LEU
6. S 8 carbonil acetato de linalol	PRO THR TYR PHE ILE ASN LEU MET
7. R carboxil acetato de linalol	ASN ILE PHE THR PRO TYR LEU
8. S carboxil acetato de linalol	ILE LEU ASN TYR PHE MET VAL
9. E nerolidol R	LEU PHE ILE TYR PRO MET THR ASN
10. E nerolidol S	LEU PHE ILE TYR PRO MET THR ASN
11. Z nerolidol R	ILE VAL MET THR LEU ASN TYR PRO PHE
12. Z nerolidol S	ILE VAL MET THR LEU ASN TYR PHE

Fonte: autoria própria, 2021.

Legenda: Tirosina (TYR); Treonina (THR); Isoleucina (ILE) Metionina (MET); Fenilalanina (PHE); Asparagina (ASN); Leucina (LEU), Prolina (PRO).

Finalizando os cálculos de acoplamento molecular nos monoterpênicos, a terceira molécula protagonista deste estudo, mirtenol, foi submetida ao *docking*, a qual obteve a melhor energia de ligação correspondente ao valor -4,9 sendo um valor bem menos estável que o propofol (-6,6) (Tabela 5 e Tabela 3). O mirtenol apresenta um carbono entre o anel e a hidroxila. A presença deste anel de seis membros em ponte e o grupo hidroxila no átomo C1 poderia potencializar a modulação positiva no receptor GABA-A. No entanto, analisando os valores de acoplamento molecular entre as moléculas do estudo, o mirtenol apresentou-se com pior energia de interação.

Como destaca Lummis et al., (2012), um modelo do local de ligação ao receptor GABA-A, com base na estrutura da proteína de ligação à acetilcolina, indica que o local é dominado por aminoácidos aromáticos fazendo interação potencial com Tyr sendo este crucial para a estabilização do receptor. No ambiente de interação do mirtenol e seus análogos (Tabela 7) observa-se a presença de diversos aminoácidos, entre eles a tyr, favorecendo a afinidade ao receptor.

Tabela 7 - Ambiente de interação do Mirtenol e análogos no sítio nativo do Propofol, Petrolina 2021.

Molécula	Aminoácidos
1. Carvacrol	ILE THR PRO PHE ASN TYR LEU
2. Timol	ILE MET PRO THR TYR PHE
3. Eugenol	PHE TYR THR ILE VAL MET LEU ASN
4. (+)-mentol	ASN TYR PHE PRO THR MET ILE VAL
5. Tagetona	ILE MET PRO THR TYR ASN PHE
6. Clorotimol	ASN MET LEU ILE TYR PRO THR PHE
7. (+)-Carvona	ASN TYR ILE THR MET LEU PHE
8. (-)-Carvona	ILE MET THR PRO TYR PHE ASN
9. α -Tujona	PRO PHE TYR ILE ASN ILE LEU MET
10. β -Tujona	ILE THR PRO TYR PHE ASN
11. R-(-)-mirtenol	ILE TYR ASN
12. Propofol	ILE MET LEU ASN TYR PHE PRO THR

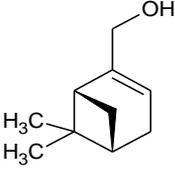
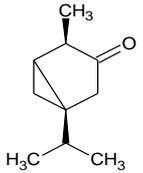
Fonte: autoria própria, 2021.

Legenda: Tirosina (TYR); Treonina (THR); Isoleucina (ILE) Metionina (MET); Fenilalanina (PHE); Asparagina (ASN); Leucina (LEU), Prolina (PRO).

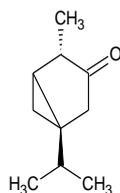
É importante constar também que o ambiente de interação do propofol e receptor GABA-A (Tabela 7) envolve aminoácidos como isoleucina (ILE), fenilalanina (PHE), tirosina (TYR), treonina (THR) e glutamina (PLC). Em contrapartida, o mirtenol interage apenas com um número mais restrito de aminoácidos, como isoleucina (ILE), tirosina (TYR) e Asparagina (ASN) na 3P50 podendo esses fatores interferirem na sua atividade GABAérgica.

Nos análogos do mirtenol, também submetidos aos cálculos de *docking*, observou-se que o único **modulador negativo** do GABA-A_R submetido ao cálculo de acoplamento molecular foi a tujona. Esta é um potente pró-convulsante (SÁNCHEZ-BORZONE et al., 2014) que age antagonizando de forma não-competitiva os receptores GABAA e desensibilizando os receptores da serotonina. As melhores energias de estabilização da Tujona na macromolécula 3P50 foram de -5,8 e -6,0 na configuração α e β , respectivamente (Tabela 8). Avaliando o ambiente interacional da tujona e os moduladores positivos observa-se que o diferencial é a presença do resíduo de aminoácido valina (VAL). Podendo justificar atividades modulatórias diferentes dessas moléculas no receptor GABAA.

Tabela 8 - Valores de energias de ligação do Mirtenol e análogos com modulação negativa com o receptor GABA-A complexado ao Propofol (3P50), Petrolina 2021.

Moléculas	Estrutura	Menores energias (3P50)
(-)-Mirtenol		-4,9
α -Tujona		-5,8

β -Tujona



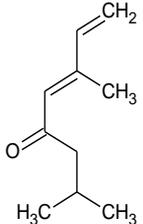
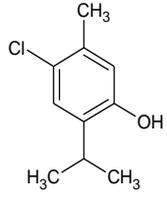
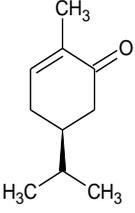
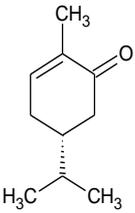
-6,0

Fonte: autoria própria, 2021.

Com **modulação positiva** do GABA-A_R, tanto a Carvona S (-6,6) quanto a R (-6,5) apresentaram valores comparáveis ao ligante nativo PFL (-6,6). O Carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) e seu isômero estrutural timol (2-isopropil-5-metilfenol), apresentaram suas melhores energia de ligação compreendendo -6,5 e -6,3, respectivamente, valores próximos ao Propofol (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de energias de ligação dos análogos com modulação positiva do Mirtenol com o receptor GABA-A complexado ao Propofol (3P50), Petrolina 2021.

Moléculas	Estrutura	Menores energias (3P50)
Carvacrol	<p>The structure shows a benzene ring with a methyl group (CH₃) at the 1-position, a hydroxyl group (OH) at the 2-position, and an isopropyl group (CH(CH₃)₂) at the 5-position.</p>	-6,5
Timol	<p>The structure shows a benzene ring with a methyl group (CH₃) at the 1-position, a hydroxyl group (OH) at the 2-position, and an isopropyl group (CH(CH₃)₂) at the 5-position.</p>	-6,3
Eugenol	<p>The structure shows a benzene ring with a methoxy group (OCH₃) at the 1-position, a hydroxyl group (HO) at the 2-position, and an allyl group (CH₂=CH-CH₂-) at the 4-position.</p>	-6,1
(+)-Mentol	<p>The structure shows a bicyclic ring system (1-methylcyclohexane) with a hydroxyl group (HO) at the 1-position (wedged bond), a methyl group (CH₃) at the 2-position (wedged bond), and an isopropyl group (CH(CH₃)₂) at the 5-position (dashed bond).</p>	-5,9

Tagetona		-5,9
Clorotimol		-6,6
(+)-Carvona		-6,6
(-)-Carvona		-6,5

Fonte: autoria própria, 2021.

Continuando com as moléculas moduladoras positivas, o Clorotimol (-6,6), apresenta melhor energia interação na macromolécula, comparado ao seu precursor Timol, com valor equivalente ao ligante propofol. Justifica-se pelo fato do Clorotimol e Propofol são compostos lipofílicos com coeficiente de partição lipossomais muito semelhantes (REINER, 2013).

O mentol, um ciclohexanol neutro, compartilha com o timol e o propofol a presença de um resíduo de isopropil adjacente a seus respectivos grupos hidroxila. A presença de uma cadeia alifática próxima ao grupo álcool é incluída como requisito essencial para a atividade desses compostos no receptor GABA (CORVALAN et al., 2009). Com relação a sua energia de ligação na proteína 3P50, observa-se na Tabela 6, entre as nove melhores poses, a de melhor interação foi -5,9.

Eugenol, apresenta energia de interação (-6,1) menos estável que o Carvacrol e Timol na molécula 3P50. Fazendo uma análise entre as moléculas descritas, o Eugenol apresenta uma menor lipofilicidade, enquanto o Timol e o Carvacrol apresentam valores intermediários, justificando os valores obtidos, já que a região transmembranar do

receptor GABAA é hidrofóbica (REINER, 2013). Finalizando com a Tagetona, sua melhor energia de interação na macromolécula em questão foi -5,9, valor inferior ao ligante nativo. Os resultados obtidos corroboram com estudos que indicam que monoterpenos estruturalmente semelhantes ao propofol demonstram atuar à nível de GABA-A_R (PREEDY, 2016; MILANOS et al., 2017).

6.0 CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou o estudo de *docking* molecular dos terpenos Nerolidol, Tetraidrolinalol e Mirtenol considerando evidências farmacológicas experimentais da ação destes sobre o receptor GABA-A (GABA-A_R), onde foi possível observar bons resultados de acoplamento molecular corroborando com os dados experimentais. Ademais, os compostos estruturalmente relacionados com conhecida modulação no GABA-A_R, obtiveram boas energias de ligação, confirmando estudos que indicam interação na macromolécula. A partir dos resultados exibidos, são listadas as seguintes conclusões:

- Os monoterpenos Tetraidrolinalol, Nerolidol e Mirtenol interagem com o domínio de ligação do propofol no GABA-A_R devido suas similaridades estruturais e físico-químicas.
- O THL e NL conservam a hidroxila em C3 da molécula de origem, contribuinte responsável pela modulação da macromolécula, e não apresentam grupos polares. Essas características favorecem à interação na região transmembranar (lipofílica) do GABA-A_R.
- O Nerolidol apresenta energia de interação pelo GABA-A_R comparável ao propofol e Tetraidrolinalol apresenta-se menos estável que o ligante nativo.
- Com relação ao Mirtenol, apesar da literatura indicar sua atividade GABAérgica positiva, sua interação foi menos estável que a molécula padrão. À vista disso, é necessário a realização de estudos posteriores visando compreender os melhores modos de interação da molécula no GABA-A_R.
- Os terpenos com modulação positiva (linalol e derivados, carvacrol, timol, eugenol, (+), mentol, tagetona, clorotimol, (+)-carvona, (-)-carvona) e modulação negativa (tujona) apresentam interação com o GABA-A_R como descrito na literatura.
- Os resultados de acoplamento molecular mostram as moléculas em estudo apresentando boa afinidade ao GABA-A_R, corroborando com testes experimentais realizados como o Tetraidrolinalol e Nerolidol, em colaboração, pelo grupo de farmacologia do colegiado de Medicina, campus Paulo Afonso-BA, sendo assim considera-se uma alternativa promissora de atuação no GABA-A_R.

- O *redocking* do propofol apresentou valores de RMSD < 2,0, indicando portanto a eficiência do algoritmo.
- O presente estudo interdisciplinar permitiu confrontar dados químicos e farmacológicos para o melhor entendimento da interação dos terpenos no GABA-AR.

7.0 REFERÊNCIAS

- APROTOSOAIÉ, A. C. et al. Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 4, p. 193–219, 2014.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997.
- BIANCHINI, A. E. et al. Monoterpenoids (Thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): Evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, p. 1–8, 2017.
- CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a Modelagem Molecular de Fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quím. Nova*, v.26, p.428-438, 2003.
- CASALINI, T. et al. Molecular modeling for nanomaterial–biology interactions: Opportunities, challenges, and perspectives. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. OCT, p. 1–14, 2019.
- CINAR, Z. The role of molecular modeling in TiO₂ Photocatalysis. **Molecules**, v. 22, n. 4, 2017.
- CHIODI, C. G. et al. Amino acid substitutions in the human homomeric $\beta 3$ GABAA receptor that enable activation by GABA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 7, p. 2375–2385, 2019.
- CORVALAN, N. A et al. Stereo-Selective Activity of Menthol on GABAA Receptor. **Chirality**, v. 21, p. 525–530, 2009.
- DIAS, R.; JUNIOR, W.F.A. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**, v. 9, p.1040-1047, 2008.
- ELSHARIF, S. A et al. Structure-Odor Relationship of linalol, linalyl Acetate and their corresponding Oxygenated Derivatives, **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p. 1-10, 2015.
- FONSÊCA, D. V. et al. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: Involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 14–22, 2016.
- GOETZ, T. et al. GABAA receptors: structure and function in the basal ganglia. **Progress in Brain Research**, v. 160, p. 21–41, 2007.
- GIOIA, D. et al. Dynamic docking: A paradigm shift in computational drug discovery. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–21, 2017.

- GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014.
- GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? **Computational Biology and Chemistry**, v. 76, p. 210–217, 2018.
- HARADA, H. et al. Linalool odor-induced anxiolytic effects in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. October, p. 1–8, 2018.
- HOSSAIN, S. J. et al. Fragrances in oolong tea that enhance the response of GABAA receptors. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1842–1848, 2004.
- LADEFOGED, L. K.; ZEPPELIN, T.; SCHIØTT, B. Molecular modeling of neurological membrane proteins – from binding sites to synapses. **Neuroscience Letters**, v. 700, p. 38–49, 2019.
- KRASOWSKI, M. D. et al. 4D-QSAR analysis of a set of propofol analogues: Mapping binding sites for an anesthetic phenol on the GABAA receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 15, p. 3210–3221, 2002.
- KITCHEN D. B.; DECORNEZ H.; FURR J. R.; BAJORATH J.; **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications**. Nature reviews Drug discovery, v. 3, p. 935-949, 2004.
- LAVERTY, D. et al. Crystal structures of a GABA A -receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 24, n. 11, p. 977–985, 2017.
- LEE, S. H. et al. Eugenol inhibits the GABAA current in trigeminal ganglion neurons. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015.
- LI, L. et al. Structure determination of two new nerolidol-type sesquiterpenoids from the soil actinomycete *Streptomyces scopuliridis*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, n. January, p. 606–609, 2016.
- LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 11, n. 2, p. 320–328, 2019.
- LIN, X.; LI, X.; LIN, X. A review on applications of computational methods in drug screening and design. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1–17, 2020.
- MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, 2013.
- MILANOS, S. et al. Metabolic products of linalool and modulation of GABAA receptors. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. JUN, p. 1–9, 2017.

- MILANOS, S. et al. Structural changes at the myrtenol backbone reverse its positive allosteric potential into inhibitory GABA A receptor modulation. **Biological Chemistry**, v. 399, n. 6, p. 549–563, 2018.
- MISHRA, R. K.; BAKER, M. T. Seizure prevention by the naturally occurring phenols, carvacrol and thymol in a partial seizure-psychomotor model. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 23, p. 5446–5449, 2014.
- MORRIS, G. M. et al. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. *Journal of computer-aided molecular design*, v. 10, n. 4, p. 293-304, 1996.
- NURY, H. et al. X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 428–431, 2011.
- PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.
- PAJARO-CASTRO, N.; CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. Neurotoxic Effects of linalool and β -pinene on *tribolium castaneum* herbst. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 1–12, 2017.
- PASSOS, C. S. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1a, p. 140–149, 2009.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.
- PREEDY V.; **Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse, Volume 2**. Academic Press, 1ª Ed., 2016. Disponível em https://books.google.com.br/books/about/Neuropathology_of_Drug_Addictions_and_Su.html?id=zu5eBwAAQBAJ&source=kp_cover&redir_esc=y. Acesso em 02/03/ 2019.
- REINER, B. G. N.; GARCÍA, D. A. “ Estudio biofísico-químico y farmacológico de compuestos fenólicos con posible actividad anestésica y / o gabaérgica ” lugar de trabajo : Cátedra de Química Biológica Ciencias Biológicas Facultad de Ciencias Exactas , Físicas y Naturales Universidad Naci. 2013.
- ROCHA G. B.; FREIRE R. O.; SIMAS A. M.; STEWART J. J.; RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *Journal of Computational Chemistry*, v. 27(10), p. 1101-1111, 2006.
- SÁ, Matheus Malta. **Modelagem molecular aplicada à elucidação dos mecanismos envolvidos na ação antiproliferativa e hemolítica das alquilfosfocolinas**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2014.

- SALMASO, V.; MORO, S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. AUG, p. 1–16, 2018.
- SÁNCHEZ-BORZONE, M. et al. Inhibitory Effects of Carvone Isomers on the GABAA Receptor in Cultures of Rat Cortical Neurons. **Chirality**, p. 1-5, 2014.
- SIGEL, E.; STEINMANN, M. E. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40224–40231, 2012.
- SILVA, Aluizio Galdino. **Estudos de QSAR e Docking Molecular de Compostos Oxadiazólicos e Tiossemicarbazônicos como Agentes Larvicidas para o Aedes Aegypti**. 2015. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Pernambuco, Pós-Graduação em Química, 2015.
- SIVAKUMAR, K. C. et al. Prospects of multitarget drug designing strategies by linking molecular docking and molecular dynamics to explore the protein–ligand recognition process. **Drug Development Research**, v. 81, n. 6, p. 685–699, 2020.
- TONG, F.; COATS, J. R. Quantitative structure-activity relationships of monoterpene binding activities to the housefly GABA receptor. **Pest Management Science**, v. 68, n. 8, p. 1122–1129, 2012.
- TORRES, P. H. M. et al. Key topics in molecular docking for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1–29, 2019.
- VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Divulgação. v. 28, n. 1, p. 95–102, 2005.
- VIANA, A. F. S. C. et al. Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. 1085–1092, 2016.
- WANG, Z. J.; HEINBOCKEL, T. Essential oils and their constituents targeting the gabaergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases. **Molecules**, v. 23, n. 5, 2018.
- WILLIAMS, D. B.; AKABAS, M. H. Structural evidence that propofol stabilizes different GABAA receptor states at potentiating and activating concentrations. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7417–7424, 2002

