

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Potencial anticonvulsivante do óleo essencial da
Croton heliotropifolius Kunth: Abordagem *in vivo* e
*in silico***

MARIA ELANE SOARES DA CUNHA

ORIENTADOR(A): PROF. DR. EVANDRO PAULO SOARES MARTINS

COORIENTADOR(A): PROF. DR. RICARDO MARTINS RAMOS

Teresina – PI
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DA *CROTON HELIOTROPIIFOLIUS*
KUNTH: ABORDAGEM *IN VIVO E IN SILICO***

MARIA ELANE SOARES DA CUNHA

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química
Orientador(a): Prof. Dr. Evandro Paulo Soares Martins

Teresina – PI

2025

C972p Cunha, Maria Elane Soares da.

Potencial anticonvulsivante do óleo essencial da Croton heliotropiifolius Kunth: Abordagem in vivo e in silico / Maria Elane Soares da Cunha. - 2025.

119f.: il.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química - PPGQ, Universidade Estadual do Piauí, 2025.

"Orientador: Prof. Dr. Evandro Paulo Soares Martins".

"Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos".

1. Epilepsia. 2. Croton heliotropiifolius Kunth. 3. Estudo in silico. I. Martins, Evandro Paulo Soares . II. Ramos, Ricardo Martins . III. Título.

CDD 540

Potencial anticonvulsivante do óleo essencial da *Croton heliotropifolius* Kunth: Abordagem *in vivo* e *in silico*

MARIA ELANE SOARES DA CUNHA

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química

Aprovado em 16 de julho de 2025.

Membros da Banca:

Documento assinado digitalmente

 EVANDRO PAULO SOARES MARTINS
Data: 10/09/2025 14:53:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr. Evandro Paulo Soares Martins

(Presidente da Banca – UESPI)

Documento assinado digitalmente

 RICARDO MARTINS RAMOS
Data: 30/08/2025 09:24:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr. Ricardo Martins Ramos

(Membro Titular – IFPI)

Documento assinado digitalmente

 FRANCISCO DAS CHAGAS ALVES LIMA
Data: 02/09/2025 16:34:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

(Membro Titular – UESPI)

Documento assinado digitalmente

 EZIO RAUL ALVES DE SA
Data: 01/09/2025 11:47:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr. Ézio Raul Alves de Sá

(Membro Titular – IFPI)

Documento assinado digitalmente

 CLEUTON DE SOUZA SILVA
Data: 08/09/2025 14:41:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr. Cleuton de Souza Silva

(Membro Suplente – UFAM)

Teresina - PI
2025

Dedico essa conquista a Deus fonte de sabedoria e força
À virgem Maria por estar sempre comigo
À minha família que acreditou nos meus esforços e me incentivou durante
esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço inicialmente a Deus, que me sustentou até aqui.
- ❖ Aos meus pais pelo apoio incondicional que me oferecem ao longo da minha vida e pelo incentivo a correr atrás dos meus sonhos, mesmo que isso significasse sacrificar os seus.
- ❖ Aos meus irmãos Amanda, Alana e Davi por todo o apoio.
- ❖ À minha avó que embora não esteja mais conosco, sua contribuição foi fundamental para que eu pudesse alcançar meus objetivos acadêmicos.
- ❖ Ao meu orientador Prof. Dr. Evandro Martins pela orientação e colaboração neste trabalho, por todo aprendizado, pela paciência e amizade.
- ❖ Ao Prof. Dr. Ricardo Martins e Prof. Dra. Rosemarie Brandim pelas sugestões e colaborações.
- ❖ A todos os colegas do grupo de pesquisa de Química de Coordenação e Modelagem Molecular (QCMM), por todos os ensinamentos compartilhados.
- ❖ Agradeço as instituições de fomento UESPI e em especial a CAPES pela bolsa concedida.

*“Ninguém te avisou que as mulheres cujos pés
foram impedidos de correr dariam à luz filhas com
asas.”*
(Ijeoma Umebinyuo)

RESUMO

CUNHA, M.E.S. **Potencial anticonvulsivante do óleo essencial da *Croton heliotropifolius* kunth: Abordagem *in vivo* e *in silico*.** 2025. 119 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

A epilepsia é uma doença crônica que afeta a qualidade de vida de milhares de pessoas, destacando a necessidade de identificar agentes anticonvulsivantes seguros e eficazes. Nesse contexto, as plantas medicinais emergem como uma fonte promissora de compostos bioativos para o tratamento da epilepsia. Neste estudo, realizamos uma investigação *in vivo* e *in silico* da atividade anticonvulsivante do óleo essencial das folhas da planta *Croton heliotropifolius* Kunth (OCH). Os resultados obtidos através de experimentos *in vivo* revelaram que o óleo essencial teve um efeito anticonvulsivante ao promover um aumento significativo na latência da primeira convulsão e na taxa de sobrevivência dos animais tratados com OCH em uma dose de 200 mg/kg. Para entender os possíveis receptores e locais de ação dos compostos presentes no óleo, realizamos um estudo de docking molecular focando nos receptores GABA_A e NMDA. Além disso, as propriedades eletrônicas dos fitoconstituintes foram calculadas no nível B3LYP/6-311++G(d,p)/SMD. Para entender os possíveis receptores e sítios de ação dos compostos do óleo, realizamos um estudo de docking molecular focando nos receptores GABA_A e NMDA. Os resultados dos estudos de docking molecular revelaram que os sesquiterpenos α-bulneseno, δ-cadineno e β-bourboneno presentes no OCH, têm alta afinidade pelo receptor GABA_A, especialmente pelo sítio α1⁺(D)/ γ2⁻(E) (sítio 1) dos BDZs, com energias de ligação no intervalo de -10.0 a -9.1 kcal/mol. Essa afinidade é mantida principalmente por meio de interações hidrofóbicas, evidenciando a importância da interação com o resíduo de aminoácido Phe77 da subunidade γ2⁻(E) do receptor GABA_A. Em relação ao NMDA, os ligantes δ-cadineno, guaiadieno e α-bulneseno apresentaram boas energias de ligação de -9.4, -8.7 e -8.4 kcal/mol respectivamente, superando a obtida para a cetamina (-7.4 kcal/mol). Essas interações foram mantidas, principalmente por interações hidrofóbicas. Além disso, a estrutura bicíclica dos sesquiterpenos mostrou-se crucial para o acoplamento nas regiões de ligação. O estudo DFT revelou que os ligantes mais promissores têm maior estabilidade, além de caráter eletrofílico de moderado a forte. Esta pesquisa fornece insights valiosos para a identificação de

novas moléculas no desenvolvimento de fitoterápicos para o tratamento da epilepsia, sugerindo que os sesquiterpenos do OCH podem ter atividade anticonvulsivante atuando por meio da modulação do receptor GABA_A ou bloqueio do NMDA.

Palavras-chave: epilepsia, *Croton heliotropifolius* Kunth, estudo *in silico*.

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic disease that affects the quality of life of thousands of individuals, highlighting the need to identify safe and effective anticonvulsant agents. In this context, medicinal plants emerge as a promising source of bioactive compounds for the treatment of epilepsy. In this study, we conducted an *in vivo* and *in silico* investigation of the anticonvulsant activity of the essential oil extracted from the leaves of *Croton heliotropifolius* Kunth (OCH). The results obtained from *in vivo* experiments revealed that the essential oil exhibited anticonvulsant effects by significantly increasing the latency to the first seizure and the survival rate of animals treated with OCH at a dose of 200 mg/kg. To understand the potential receptors and sites of action of the compounds present in the oil, a molecular docking study was carried out focusing on the GABA_A and NMDA receptors. Additionally, the electronic properties of the phytoconstituents were calculated at the B3LYP/6-311++G(d,p)/SMD level. Molecular docking results indicated that the sesquiterpenes α-bulnesene, δ-cadinene, guaiadiene and β-bourboneno —present in the OCH—exhibit high affinity for the GABA_A receptor, particularly at the α1⁺(D)/γ2⁻(E) (site 1) benzodiazepine binding site, with binding energies ranging from -10.0 to -9.1 kcal/mol. This affinity is primarily maintained through hydrophobic interactions, especially involving the Phe77 residue of the γ2⁻(E) subunit of the GABA_A receptor. Regarding the NMDA receptor, the same ligands δ-cadinene, guaiadiene, and α-bulnesene also exhibited favorable binding energies of -9.4, -8.7 and -8.4 kcal/mol, respectively, surpassing that of ketamine (-7.4 kcal/mol). These interactions were also predominantly driven by hydrophobic contacts. Moreover, the bicyclic structure of the sesquiterpenes proved crucial for fitting within the binding regions. The DFT analysis revealed that the most promising ligands showed higher stability and moderate electrophilic character. This research provides valuable insights into the identification of new molecules for the development of phytotherapeutics for epilepsy, suggesting that the sesquiterpenes from OCH may exert anticonvulsant activity through modulation of the GABA_A receptor and/or NMDA receptor blockade.

Keywords: epilepsy, *Croton heliotropifolius* Kunth, *in silico* study

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Sítios de ligação do GABA nas duas interfaces $\alpha\beta$ e interface $\alpha\gamma$ de ligação do diazepam do GABA _A	29
Figura 2.2. Sítios de ligação do diazepam nas duas interface $\beta\alpha$ e na interface $\beta\gamma$ do GABA _A	30
Figura 2.3. Local de ligação da cetamina e outros bloqueadores (por exemplo, memantina, MK-801) que bloqueiam esse canal de maneira não competitiva, por uma ligação específica ao local de ligação da fenciclidina	32
Figura 2.4. Estrutura química do diazepam, carbamazepina, fenitoína, lamotrogina e valporato semissódico utilizados no tratamento da epilepsia	33
Figura 2.5. Arbustos do <i>C. heliotropifolius</i>	38
Figura 4.1. Efeito do óleo essencial de <i>Croton heliotropifolius</i> Kunth (OCH), (n=6/grupo). Folhas, em doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o) sobre a latênci para a primeira crise induzida por Pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão.	66
Figura 4.2. Efeito do óleo essencial de <i>Croton heliotropifolius</i> Kunth. Folhas (OCH), em doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o) sobre a latênci para a morte dos animais, após a indução de convulsões por Pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão ((n=6/grupo)). Diferença estatisticamente significativa se p<0,05 (ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey), **p<0,01 e ***p<0,001, comparado ao grupo controle negativo.	67
Figura 4.3. Sobreposição do ligante obtida por microscopia eletrônica DZP (bege) com os ligantes de redocking(azul) nos sítios de ligação 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) do GABA _A , e do ligante 4-[(1R,2S)-2-(4-benzylpiperidin-1-yl)-1-hydroxypropyl]phenol (bege) com o ligante de redocking (azul) no sítio 5 do receptor NMDA.....	68
Figura 4.4. Poses do diazepam (azul) e dos ligantes com maior afinidade pelo sítio 1 do GABA _A (rosa) e diagramas 2D das interações com resíduos-chave, com destaque para o resíduo Phe77.	75
Figura 4.5. Poses da cetamina (amarelo) e dos ligantes com maior afinidade pelo sítio 5 do NMDA (vermelho) e diagramas 2D das interações com resíduos-chave.....	80
Figura 4.6. Orbitais de fronteira (HOMO-LUMO) e Gap dos compostos com maior afinidade pelos receptores calculados a nível B3LYP/6-311++G(d,p). ..	82

Figura 4.7. Mapas de Potencial Eletrostático Molecular dos compostos calculados a nível DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) com valores de isosuperfícies de 0,002 a.u 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Compostos identificados no óleo essencial das folhas de <i>C. heliotropifolius</i>	42
Tabela 2.1. Avaliação <i>in silico</i> das propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) dos 33 constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Croton heliotropifolius</i> Kunth.....	43
Tabela 3.1. Resíduos da proteína envolvidos no sítio de interação com o ligante, com as coordenadas (X, Y, Z) em Å.....	65
Tabela 4.1. RMSD (Å) dos ligantes co-resolvidos por microscopia eletronica, após procedimento de redocking nos sitios 1, 2, 3 e 4 do receptor GABA _A e sitio 5 do receptor NMDA.....	68
Tabela 4.2. Energias de ligação obtidas para os compostos identificados no OCH e fármacos de referência nos sítios de ligação alvo dos receptores GABA _A	71
Tabela 4.3. Resíduos de aminoácidos do sitio 1 envolvidos na interação ligante e receptor do GABA _A	76
Tabela 4.4. Energias de ligação obtidas para os compostos do OCH e fármaco de referência no sítio de ligação alvo do receptor NMDA.....	78
Tabela 4.5 Resíduos de aminoácidos do sitio 5 envolvidos na interação ligante e receptor NMDA.	81
Tabela 4.6. Descritores globais de reatividade química dos ligantes com maior afinidades pelos receptores calculados a nível B3LYP/6-311++G(d,p) em fase aquosa.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA- 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic;

BDZs- Benzodiazepínicos;

CADD- Design de medicamentos auxiliado por computador;

DAE- Drogas antiepilepticas;

DFT – Teoria do Funcional da Densidade;

DZP- Diazepam;

ECD- Domínio extracelular;

GA- Algoritmos genéticos;

GABA- Ácido γ -aminobutírico;

GABA_A- Ácido γ -aminobutírico tipo A;

GABA_B- Receptor ácido γ -aminobutírico tipo B;

GABA_C- Receptor ácido γ -aminobutírico tipo C;

GGA- Aproximações generalizadas de gradientes;

GTOs- Orbitais atômicos do tipo gaussiana;

HOMO- Orbital de maior energia ocupado

IC- Construção incremental;

ILAE – Liga International Contra a epilepsia;

LDA- Local Density Approximation;

LUMO- Orbital de mais baixa energia ocupado;

MC- Simulações de Monte Carlo;

MPE-Molecular Electrostatic Potential;

NMDA- N-methyl-D-aspartate;

OCH- Óleo essencial das folhas da espécie *Croton heliotropifolius* Kunth;

PTZ- Pentilenotetrazol;

CADD – Computer-Aided Drug Design

SE-status epilepticus ;

SM- Correspondência de formas;

STOs- Orbitais atômicos do tipo Slater;

α_1^+/γ_2^- -Interface D/E do receptor GABA_A;

β_2^+/α_1^- -Interface C/D do receptor GABA_A;

β_2^+/α_1^- -Interface A/B do receptor GABA_A;

β_2^-/γ_2^+ - Interface A/E do receptor GABA_A.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos.....	18
1.2 Epilepsia e plantas medicinais	20
1.3 Objetivos	24
1.3.1 Gerais	24
1.3.2 Específicos	24
CAPÍTULO 2 - REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1 Fisiopatologia da epilepsia	25
2.2 Neurotransmissores e epilepsia	27
2.3 Tratamento farmacológico para a epilepsia.....	33
2.4 Uso de plantas medicinais e fitoterápicos	36
2.4.1 Espécie <i>Croton heliotropifolius Kunth</i>	38
2.5 Técnicas computacionais aplicadas no desenvolvimento de fármacos	45
2.5.1 Docking molecular	45
2.5.1.1 Algoritmos de busca.....	47
2.5.1.2 Funções de pontuação.....	50
2.5.2 Teoria do Funcional da Densidade (DFT).....	52
2.5.2.1 Funções de base.....	55
2.5.2.2 Funcionais de troca e correlação eletrônica	58
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA <i>IN VIVO</i> E <i>IN SILICO</i>.....	61
3.1 Procedimentos éticos	61
3.2 Protocolo experimental.....	61
3.3 Análise estatística dos dados	62
3.4 Estudo DFT	62
3.5 Docking Molecular.....	63
3.5.1 Preparação dos ligantes	63
3.5.2 Preparação das proteínas.....	64
3.6 Redocking e docking molecular.....	65
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1 Atividade anticonvulsivante <i>in vivo</i>	66

4.2 Validação da metodologia de docking molecular por redocking	67
4.3 Docking molecular	69
4.3.1 <i>Docking molecular com o receptor GABA_A</i>	69
4.3.2 <i>Docking molecular com o receptor NMDA</i>	77
4.4 Cálculos DFT	82
4.4.1 <i>Análise dos Orbitais de fronteira (FMOs)</i>	82
4.4.2 <i>Descritores de reatividade química</i>	83
4.4.3 <i>Mapa de potencial eletrostático molecular</i>	85
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE A- RESULTADOS DO DOCKING MOLECULAR.....	114
APÊNDICE B-RESULTADOS DFT.....	118

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos

A descoberta de novos medicamentos está intrinsecamente ligada às inovações científicas e tecnológicas. Os significativos avanços nas áreas de química, biologia e medicina aliadas a metodologias inovadoras, algorítmicos avançados e recursos computacionais como supercomputadores, clusters e computação em nuvens, têm contribuído para a redução no tempo necessário para a identificação de novos compostos, possibilitando a formulação de terapias notáveis (1).

O estágio experimental inicial no desenvolvimento de um fármaco consiste na identificação de um composto que apresente atividade biológica em relação a um alvo molecular específico. Em seguida, na fase pré-clínica, são realizados testes tanto *in vitro* como em modelos de animais para a obtenção de conhecimento aprofundado sobre as propriedades farmacológicas e os efeitos adversos do fármaco em desenvolvimento. A etapa final envolve estudos *in vivo* que podem incluir tanto animais como seres humanos, em diversas fases, em um processo denominado estudo clínico, que requer análises precisas. Nessa fase, são avaliados a segurança e a dosagem em um pequeno grupo de voluntários saudáveis, a eficácia e os riscos associados em um grupo maior de pacientes com a doença alvo, além da confirmação da eficácia e monitoramento de efeitos adversos em um grande número de pacientes (2). Apesar da importância do desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de diversas doenças, essa atividade traz consigo alguns desafios significativos, incluído a ocorrência de efeitos adversos. O processo pra criar um novo medicamento é longo, complexo e custoso, frequentemente levando mais de 10 anos e cerca de dois bilhões de dólares do início do projeto até o lançamento no mercado (3).

O planejamento de novos fármacos envolve recursos tecnológicos que buscam minimizar o tempo e reduzir os gastos com as operações envolvidas durante as

etapas do processo de desenvolvimento de um fármaco (4). Nesse contexto, o Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (do inglês, Structure Based Drug Design – SBDD) emergiu como uma abordagem inovadora, permitindo o armazenamento e manipulação de bibliotecas de moléculas pequenas para triagem em relação a alvos moleculares, geralmente proteínas (5). A popularidade do SBDD é crescente, impulsionada pela disponibilidade de estruturas 3D de alvos moleculares e potencias ligantes.

As metodologias computacionais mais conhecidas e utilizadas na SBDD incluem: docking molecular, triagem virtual baseada em estruturas e dinâmica molecular. Nas últimas décadas, diversas tecnologias têm sido utilizadas em projetos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Dentre elas, destaca-se o docking molecular, que é utilizado para prever a interação entre moléculas e o sítio ativo do alvo molecular, identificando possíveis ligantes com características químicas favoráveis (6). Além disso, cálculos baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) oferecem um amplo espectro de dados e informações que podem ser convertidas em conhecimento químico e biológico, orientando a identificação e otimização de novos candidatos a fármacos.

As abordagens experimentais apresentam limitações práticas, uma vez que cada bioensaio *in vitro*, por exemplo, utiliza uma grande quantidade de reagentes, incluindo valiosos receptores clonados e expressos. Nesse contexto, a química computacional surge como uma alternativa eficiente, permitindo a identificação rápida e precisa de compostos promissores, que podem ser posteriormente sintetizados e testados (7).

No estudo *in silico*, a primeira etapa consiste na identificação de potenciais candidatos, conhecidos como “hits”, que idealmente exibem algum grau de potência e especificidade em relação ao alvo terapêutico, podendo envolver triagem virtual, análise de estruturas químicas, propriedades farmacológicas (8). Em seguida, realiza-se uma triagem virtual, que pode incluir docking molecular, para avaliar a interação entre compostos químicos e o sítio ativo de proteínas ou alvos moleculares, onde serão ordenadas por função de pontuação baseada na energia de ligação, reduzindo significativamente o número de candidatos a serem testados experimentalmente.

Na fase subsequente, os candidatos mais promissores são otimizados ou isolados e submetidos a testes *in vitro* em ensaios experimentais. Por fim, esses

compostos passam por testes *in vivo*, envolvendo tanto animais como seres humanos, até a sua disponibilidade clínica.

1.2 Epilepsia e plantas medicinais

A epilepsia é um distúrbio neurológico podendo ser caracterizado pelo desequilíbrio excitatório ou inibitório que ocorre no sistema nervoso central (SNC) de forma espontânea e recorrente, atingindo mais de 75 milhões de pessoas no mundo (9), com mais 80% dos pacientes residindo em países em subdesenvolvimento ou em desenvolvimento, onde a qualidade de vida é pior e a incidência de infecções que afetam o SNC é grande (10). No estudo da fisiopatologia da epilepsia, as crises envolvem vários sistemas de neurotransmissores como o gabaérgico (11), glutamatérgico (12), serotoninérgico (13) e dopaminérgico (14), sendo assim alvo de muitos medicamentos e de fitoterápicos no combate da epilepsia.

A incidência da epilepsia tende a ser maior em homens do que em mulheres (15). Estudos sugerem que essa disparidade pode estar relacionada a maior exposição a fatores de risco em homens e, também, à subnotificação de casos em mulheres devido a fatores socioculturais em determinadas regiões (15,16).

Embora todas as pessoas com epilepsia tenham convulsão, nem todos os indivíduos com convulsão possuem epilepsia. De acordo com a A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) a epilepsia pode ser definida como uma condição neurológica crônica em que a pessoa apresenta duas ou mais convulsões não provocadas em um intervalo de 24h, devido a atividade anormal do cérebro; ou uma crise epiléptica não provocada, que aumenta a probabilidade de ocorrências de outras crises em pelos menos 60% após duas crises epilépticas não provocadas, dentro dos próximos 10 anos; ou por meio de diagnóstico de uma síndrome epiléptica (17).

Porém, de forma geral para estudos populacionais a ILAE define a epilepsia como a ocorrência de pelo menos duas crises epilépticas não provocadas (ou reflexas) em um intervalo superior a 24h (17). As convulsões por sua vez, podem ser provocadas por diversas condições médicas como traumas na cabeça, febre alta caracterizadas por contrações musculares involuntárias, e descontrolados do corpo e alterações da consciência.

O ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_A) é um dos principais receptores inibitórios nas sinapses cerebrais (18), sendo alvo de muitos medicamentos que agem em diferentes sítios de ligação, como os benzodiazepínicos (BDZs) que atuam como moduladores no sítio de ligação GABA_A/BDZs potencializando a atividade do neurotransmissor inibitório GABA (ácido γ -aminobutírico), responsável por reduzir a hiperexcitabilidade neuronal e subsequente desenvolvimento das crises convulsivas ou epilépticas (19).

Outros receptores associados à epilepsia são os receptores extra-sinápticos do tipo N-methyl-D-aspartate (NMDA), compostos predominantemente pelas subunidades NR1(GluN1) e NR2B (GluN2B), que demonstraram ter um papel crucial na prevenção da morte neuronal associados à toxicidade do glutamato (20). Na busca por agentes que possam antagonizar a atividade desse receptor, a cetamina, um antagonista não competitivo do receptor NMDA, destaca-se por sua capacidade de bloquear ou inibir a atividade glutamatérgica, inibindo as crises convulsivas e prevenindo a neurodegeneração (21).

O tratamento das crises convulsivas e epilépticas é realizado normalmente com fármacos de origem sintética como diazepam, valporato semissódico, fenitoína e carbamazepina (22,23). No entanto, cerca de 25-45% dos casos não respondem adequadamente ao medicamento utilizado no tratamento, sendo insuficientes para o controle das crises. (24). Além disso, podem apresentar efeitos colaterais adversos como sedação, depressão, insônia e fadiga (25). Uma abordagem promissora para encontrar novos fármacos anticonvulsivantes e aprimorar a terapia da epilepsia consiste em explorar compostos naturais provenientes de plantas utilizadas na medicina popular.

As comunidades tradicionais utilizam as plantas medicinais como remédios caseiros devido as suas propriedades terapêuticas, sendo consideradas matérias-primas valiosas para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (26). Diversos produtos podem ser obtidos a partir dessas plantas, entre os quais se destacam os óleos essenciais (OEs), que são substâncias voláteis, odoríferas e pouco solúveis em água, desempenhando funções biológicas crucias para a sobrevivência das plantas (27), incluindo mecanismos de defesa contra microrganismos, insetos e animais (28).

Pesquisas recentes demonstram que extratos, óleos essenciais e compostos isolados de várias plantas apresentam atividade anticonvulsivante ao atuarem no sistema nervoso central (29,30). Assim, esses compostos representam uma fonte importante para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos anticonvulsivantes. Um estudo conduzido por Ueno e colaboradores evidenciou que o monoterpeno α -pineno, encontrado em diversas plantas, reduziu a incidência de convulsões em camundongos em um modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ) (31).

Estudo da composição do óleo essencial das folhas da espécie *Croton heliotropifolius* Kunth (OCH) indicam como constituintes químicos uma mistura de monoterpenos (63,79%) e sesquiterpenos (32,98%) (32). Os monoterpenos têm propriedades miorrelaxante, antimicrobiana, antiespasmódica, antidepressiva, anti-inflamatória, ansiolítica e anticonvulsivante (33,34). Além disso, um estudo com o óleo essencial de *Croton zehntneri* demonstrou um aumento do limiar para o surgimento das convulsões mínimas induzidas por PTZ (35), sugerindo um potencial anticonvulsivante para plantas pertencentes ao gênero *Croton*.

Embora abordagens *in vivo* e *in vitro* sejam frequentemente empregadas em ensaios pré-clínicos para a obtenção de novos fármacos, esses métodos podem ser dispendiosos e demandar um tempo significativo de pesquisa. Contudo, os avanços em bioinformática e o uso de ferramentas *in silico*, como o acoplamento molecular e cálculos teóricos baseados na teoria do funcional da densidade (DFT), têm se mostrado eficientes na otimização do tempo necessário para a obtenção de resultados (36).

Através do estudo de docking molecular, foi identificado que o terpinen-4-ol, presente nos extratos de *Eclipta alba* e *Pistacia Wholeriama*, contribuiu para a atividade anticonvulsivante associada a canais de sódio dependentes de voltagem (VGSCs) (37). Adicionalmente, pesquisas demonstraram que o ácido isovalérico e o didrovaltrato, ambos encontrados na planta *Valeriana officinalis*, atuaram como inibidores da aminotransferase do ácido γ -aminobutírico (GABA-AT), responsável pela degradação do principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, o GABA (38).

As propriedades farmacológicas dos ligantes também podem estar relacionadas com suas propriedades eletrônicas, com isso o uso do método

computacional com base na DFT também tem se mostrado bastante eficaz na explicação de propriedades estruturais, termodinâmicas e eletrônicas de moléculas com boa exatidão e custo computacional relativamente baixo (39). Em um estudo *in silico* realizado por meio do docking molecular e métodos DFT, foram analisados os constituintes da planta *Matricaria* em relação ao tratamento da Covid-19. Os resultados revelaram propriedades significativas, como afinidade de ligações pelos receptores, reatividade e estabilidade das moléculas, permitindo avaliar suas atividades antivirais (40).

Com base nisso, realizamos uma investigação *in vivo* e *in silico* da atividade anticonvulsivante do óleo essencial das folhas da planta *C. heliotropifolius* Kunth. O estudo de acoplamento molecular dos 33 constituintes do OCH com os receptores GABA_A e NMDA foi realizado para avaliar a afinidade e a natureza das interações intermoleculares. Esses receptores foram escolhidos porque estão associados a convulsões e crises epilépticas. Além disso, as propriedades eletrônicas dos ligantes foram investigadas usando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT). Os orbitais moleculares de fronteira, o mapa de potencial eletrostático e alguns descriptores de reatividade química frequentemente correlacionados com atividades biológicas foram calculados.

1.3 Objetivos

1.3.1 Gerais

Investigar a atividade anticonvulsivante do óleo essencial de *C. heliotropifolius* (OCH) por meio de estudos *in vivo* e *in silico*.

1.3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropifolius* sobre as convulsões induzidas por pilocarpina.
- Realizar simulações de docking molecular dos constituintes OCH com receptores GABA_A e NMDA, analisando as energias de ligação, conformações e interações intermoleculares.
- Obter as propriedades eletrônicas dos fitoconstituintes do OCH via DFT, tais como orbitais moleculares de fronteira, mapa de potencial eletrostático e alguns descritores de reatividade química.
- Classificar os constituintes do óleo essencial estudado como bons candidatos ou não, à fármacos no combate a convulsão.

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fisiopatologia da epilepsia

As causas da epilepsia podem ser diversas e envolvem múltiplos fatores. A ILAE categorizou diferentes grupos etiológicos associados a epilepsia, que incluem aspectos estruturais, genéticos, infecciosos, metabólicos, imunológicos, além de causas desconhecidas e a relação com neurotransmissores. Essa classificação detalhada permite que os profissionais de saúde associem a tratamentos, sejam eles medicinais ou cirúrgicos direcionado para a epilepsia.

A etiologia estrutural refere-se a fatores estruturais que afetam a anatomia do SNC e que podem levar a uma suscetibilidade da epilepsia. Exemplos incluem anomalias no desenvolvimento cerebral, malformações corticais, acidente vascular cerebral (AVC), traumatismo e infecções (41,42).

Além de fatores estruturais, estudos indicam que a predisposição genética também pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento dessa patologia. Certos genes relacionados à susceptibilidade à epilepsia, incluindo aqueles que codificam receptores de neurotransmissores e proteínas que regulam a excitabilidade celular, podem contribuir para desequilíbrios na atividade cerebral, resultando em crises epilépticas (43,44).

As causas infecciosas da epilepsia referem-se a casos em que o desenvolvimento das crises é resultado de processos pós-infecciosos. Essas infecções abarcam condições sistêmicas graves, infecções cerebrais, tuberculose, HIV (vírus da imunodeficiência humana), malária cerebral, meningite bacteriana, toxoplasmose cerebral e infecções congénitas como a do vírus Zika e citomegalovírus (41,42). Portanto, é fundamental considerar as causas infecciosas como urgências médicas que requerem tratamento imediato.

Distúrbios metabólicos também podem contribuir para o desenvolvimento da epilepsia. Anomalias no metabolismo cerebral, deficiência de vitaminas, acúmulo de toxinas e distúrbios na síntese de neurotransmissores, como GABA e glutamato, podem afetar a excitabilidade neuronal, aumentando a probabilidade de crises epilépticas (45,46).

Outro fator determinante no desenvolvimento das epilepsias está relacionada a fatores imunológicos, que surgem diretamente de uma disfunção imunológica, manifestando-se principalmente através das crises epilépticas (42). Um exemplo notável é a encefalite de Rasmussen, que se caracteriza como uma inflamação unilateral do córtex (47). Em muitos casos as epilepsias podem ter uma causa desconhecida, sendo diagnosticada como sendo epilepsia de etiologia idiopática (42).

A epilepsia é uma condição crônica e não transmissível, que pode ocasionar consequências adversas, impactando negativamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Devido à grande incidência dessa doença, desde do século 19, houve a necessidade de classificar os diferentes tipos clínicos de fenômenos epilépticos. A classificação das epilepsias é um recurso clínico essencial que visa proporcionar ao paciente uma intervenção adequada (41). Essa classificação influencia todas as decisões médicas e impacta também o desenvolvimento de novas terapias.

A classificação mais recente das epilepsias pela ILAE apresenta uma nova estrutura que inclui três níveis: tipo de convulsão, tipo de epilepsia e crise epiléptica. O primeiro nível consiste em classificar o tipo de crise. As crises são classificadas como tendo início focal, generalizado ou desconhecido. As crises epilépticas focais são originárias de um início localizado a redes limitadas de um hemisfério cerebral, enquanto as crises generalizadas são definidas como atividade epiléptica síncrona em ambos os hemisférios cerebrais desde o início. As crises de início desconhecido ocorrem sem uma causa identificável (42,48).

O segundo nível refere-se ao tipo de epilepsia, que pode ser focal, generalizada, focal e generalizada simultaneamente, ou de tipo desconhecido (42). As epilepsias focais são caracterizadas por distúrbios uni ou multifocais, com crises que se originam em áreas específicas do cérebro. Diferentes tipos de crises podem ocorrer, manifestando-se como crises de sintomas motores, sensóriais, autônomos ou

psíquicos. Além disso, as crises epilépticas podem ser subdivididas em crises focais com preservação da consciência e crises focais sem preservação da consciência (42).

As epilepsias generalizadas afetam ambos os hemisférios cerebrais simultaneamente e incluem crises como crises de ausência, mioclônicas, tônica, clônica, e tônico-clônicas (49). As epilepsias focais e generalizadas por sua vez abrangem indivíduos que têm tanto crises generalizadas como focais. Exemplos frequentes de condições que apresentam ambos os tipos de crises incluem a síndrome de Dravet e a síndrome de Lennox-Gastaut (42). O último nível na classificação é utilizado quando não é possível determinar se a epilepsia é focal ou generalizada, devido à falta de dados suficientes para fazer um diagnóstico (42).

2.2 Neurotransmissores e epilepsia

Em resposta a um potencial de ação, os neurotransmissores são liberados da pré-sináptica e ativam receptores ianotrópicos e metabolotrópicos na pós-sinapse, gerando um potencial pós-sináptico (50). O equilíbrio entre excitação e inibição é essencial para manter a dinâmica do SNC, onde o glutamato, principal neurotransmissor, é compensando pelo principal neurotransmissor inibitório, o GABA (43). A desregulação de um ou ambos podem estar associados a origem de crises e diversos distúrbios do SNC.

O receptor GABA_A é um dos principais mediadores da inibição neuronal e atua tanto em regiões sinápticas como extrasinápticas, desempenhando papel fundamental no controle da excitabilidade cerebral (51). Alterações nesse sistema têm sido implicadas na fisiopatologia de diversas epilepsias. Embora as sinapses GABAérgicas sejam amplamente distribuídas, o cérebro apresenta grande diversidade sináptica, incluindo glutamatérgica, colinérgica e serotoninérgica, o que reforça a complexidade neuroquímica envolvida na gênese e no controle das crises.

O ácido γ -aminobutírico (GABA) atua em diferentes processos fisiológicos, como na resposta a estressores, em processos motores, controle da dor e também em situações de ansiedade, retardo mental, epilepsia e distúrbio do sono (52,53). Sua transmissão sináptica inibitória é mediada por canais ionotrópicos GABAérgicos que possuem permeabilidade ao cloreto. O GABA, é armazenado em vesículas sinápticas,

sofrem exocitose em resposta ao aumento da concentração de Ca^{2+} , onde se ligam a receptores pós-sinápticos (53).

Após a ativação neuronal o GABA é liberado e se liga a seus principais receptores, os receptores ionotrópicos GABA_A e GABA_C e os receptores metabotrópicos GABA_B , que diferem em estrutura, propriedades biofísicas e farmacologia (54). Os receptores GABA_A são canais iônicos pertencentes a superfamília Cys-loop, que incluiu também receptores de nicotínicos de acetilcolina, glicina e serotonina. A ligação do GABA ao sítio de ligação no domínio extracelular do GABA_A aumenta o fluxo de íons cloreto, levando assim a uma hiperpolarização da membrana, resultando em um aumento do limiar de disparo e consequentemente uma redução na probabilidade de iniciação do potencial de ação, causando a inibição neuronal (54,55).

Os receptores GABA_A , principais inibitórios no SNC, desempenham um papel crucial na mediação de várias ações farmacológicas. Esses receptores são canais de íon cloreto controlados por ligantes, identificados farmacologicamente pela primeira vez como sendo ativados pelo GABA, bloqueados por biculina e pictroxina, e modulados por uma variedade de drogas como BDZs, barbitúricos, esteroides neuroativos, anestésicos e anticonvulsivantes (56), e também por compostos naturais de origem vegetal (12,57). Essas drogas produzem seus efeitos farmacológicos relevantes ao interagir com locais distintos dos receptores GABA_A , assim conclui-se que os receptores GABA_A estão envolvidos no controle da excitabilidade celular, modulação da ansiedade, cognição, medo, aprendizagem e memória (58) (59).

Esses receptores são formados por cinco subunidades que pertencem a diferentes classes de subunidades (58), gerando uma ampla variedade de subtipos de receptores com diferentes composições e propriedades farmacológicas. Estão disponíveis 19 subunidades, incluindo 19 α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π para os receptores GABA_A , 3 subunidades rho (ρ) que contribuem para o receptor GABA_C (60,61).

Cerca de 30% dos receptores GABA_A são constituídos com prevalência de uma subunidade α , duas β e duas subunidades γ ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$). Essa conformação representa a principal forma sináptica do receptor GABA_A envolvida na inibição faísca rápida do sistema nervoso central. Na parte extracelular, os dois sítios de ligação do GABA estão localizados nas duas interfaces $\alpha\beta$. Esses receptores também são alvos

importantes de benzodiazepínicos (BDZs) com sítio de ligação de alta afinidade localizado na interface $\alpha\gamma$, Figura 2.1.

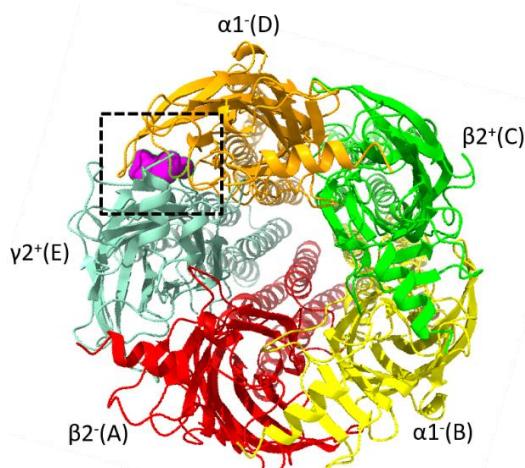


Figura 2.1. Sítio de ligação do diazepam na interface $\alpha\gamma$ GABA_A.

Agentes que potencializam a ação do GABA nos receptores GABA_A são conhecidos por moduladores positivos, como destaque para os BDZs, que promovem a hiperpolarização da membrana e inibem os potenciais de ação, reduzindo a atividade convulsiva (12). Em contrapartida, os agentes que diminuem a eficácia do GABA são chamados de moduladores alostéricos negativos, apresentando efeitos opostos aos BDZs. Além disso, os agentes que bloqueiam as ações tanto dos moduladores positivos quanto dos negativos são conhecidos como alostéricos neutralizantes, sendo o flumazil um exemplo de BDZ com essa função (62).

Os moduladores classificados como positivos de segunda ordem atuam em sinergia com um modulador positivo de primeira ordem, como o diazepam. Pesquisas indicam que flavonoides dietéticos, como a apigenina e galato de (-)-epigalocatequina não exercem uma ativação direta nos receptores GABA_A, mas demonstram a capacidade de potencializar a ação moduladora do diazepam. Essa interação de segunda ordem parece ser específica para moduladores de primeira ordem da classe dos BDZs. A modulação de segunda ordem parece estar relacionada com uma possível alteração no acoplamento dos sítios alostéricos dos BDZs e nos sítios alostéricos de ligação do GABA nos receptores GABA_A. Dessa forma, os moduladores de segunda ordem não somente oferecem benefícios adicionais ao influenciar a ação

dos moduladores alostéricos de primeira ordem, mas também podem contribuir para a redução da dose necessária de fármacos que atuam como moduladores de primeira ordem, como é o caso dos BDZs (62).

A ligação dos BDZs não provoca alterações na conformação do domínio extracelular, mas facilita a ação de ligantes agonistas como o GABA (54). Também foram identificados sítios de ligação adicionais para os BDZs no TMD, incluindo dois nas interfaces das cadeias $\beta\alpha$, e uma na interface $\beta\gamma$, Figura 2.2. No entanto, esses sítios frequentemente exibem baixa afinidade pelo alvo, o que pode explicar porque os ligantes dos sítios dos BDZs sozinhos não ativam o canal na ausência do GABA.

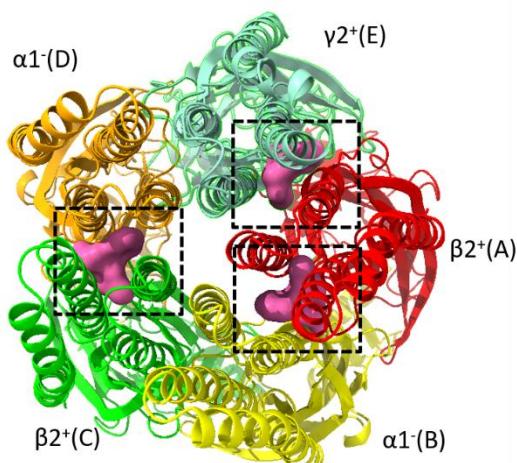


Figura 2.2. Sítios de ligação do diazepam nas duas interfaces $\beta\alpha$ e na interface $\beta\gamma$ do GABA_A.

Os receptores GABA_B pertencem a superfamília dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e são responsáveis pelo efeito neuromodelador do GABA (63). Esses receptores agem através da ativação, por segundos mensageiros, dos canais de K⁺ e, consequentemente, hiperpolarização da célula pós-sináptica, que pode também diminuir a condutância de Ca²⁺, resultando na diminuição prolongada na excitabilidade neuronal (53). Esses receptores foram propostos como alvos de fármacos para alguns distúrbios como dependência química, ansiedade e epilepsia (63,64).

Os receptores GABA_C, embora menos abundantes no SNC, são encontrados principalmente na retina. Os fármacos que atuam no GABA_C são usados no tratamento de distúrbios visuais, do sono e cognitivo (62).

Os mecanismos glutamatérgicos excitatórios estão envolvidos em convulsões agudas, transitórias e evocadas (12). A neurotransmissão excitatória é mediada pela transmissão do aminoácido L-glutamato, que ativa os receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs) e metabolotrópicos (mGluRs) expressos nos neurônios pós-sinápticos. Os receptores iGluRs compreendem principalmente três famílias, 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA), receptores NMDA e receptores de cainato (50).

Os receptores NMDARs são receptores ionotrópicos de glutamato que se ativam mediante a ligação do neurotransmissor glutamato na presença de um coagonista, como a glicina (65). Quando o receptor está em repouso, íons de Mg²⁺ ficam ligados a um sítio dentro do canal iônico bloqueando o influxo de Ca²⁺. Para que o canal seja ativado, são necessários três fatores: (1) ligação do glutamato; (2) ligação de glicina (coagonista obrigatório); e (3) despolarização da membrana pós-sináptica (66). Quando ativados, os receptores NMDA sofrem uma alteração conformatacional alostérica que reduz a afinidade pelo Mg²⁺, permitindo a entrada de íons, como Ca²⁺, K⁺ e Na⁺, nas células, o que desempenha um papel crucial na transmissão sináptica e no início da plasticidade neuronal (50).

A ativação do receptor NMDA é facilitada pelos receptores AMPA, que estão localizados ao lado de receptores NMDA. Uma vez ativados, esses receptores agem no sentido de aumentar ainda mais a despolarização iniciada pelos receptores AMPA (66).

Os receptores NMDARs são amplamente expressos no SNC dos mamíferos mediando a sinalização excitatória pós-sináptica (67). Eles estão relacionados a processos fisiológicos normais, como o desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica, aprendizado e memória. No entanto, a presença do glutamato em altas concentrações na fenda sináptica por períodos prolongados pode se tornar uma potente neurotoxina, e sua excitotoxicidade tem sido associada a distúrbios e doenças neurológicas como Alzheimer, epilepsia, doença de Parkinson, depressão e esquizofrenia (67,68)

Existem vários agonistas e antagonistas para os diferentes sítios de ligação no receptor NMDA. O sítio de ligação preferencial para as drogas psicotogênicas está localizado no bolso de ligação comum à penciclidina (PCP), dizocilpina (MK801) e cetamina, sendo acessível somente quando o canal iônico está aberto. Como essas

drogas não competem com o mesmo sitio de ligação do neurotransmissor excitatório glutamato, são chamadas de antagonistas não-competitivos (66), Figura 2.3. Compostos de origem vegetal, também já foram relatados por interagirem diretamente com os receptores NMDA (12).

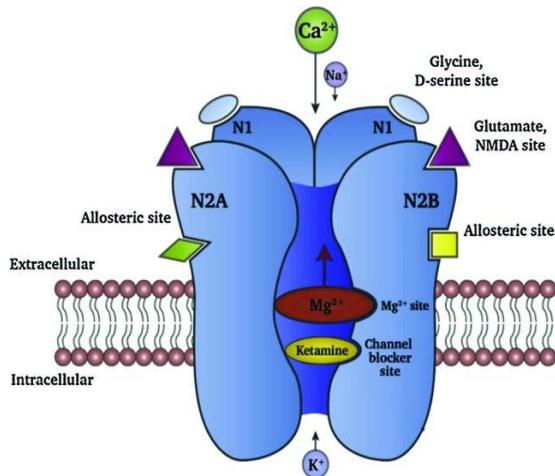


Figura 2.3. Local de ligação da cetamina e outros bloqueadores (por exemplo, memantina, MK-801) que bloqueiam esse canal de maneira não competitiva, por uma ligação específica ao local de ligação da fenciclidina (69,70).

Esse receptor é formado por três famílias de subunidades: GluN1, GluN2 e GluN3, podendo existir tetrâmeros formados por GluN1/GluN2, GluN1/GluN2/GluN3 ou GluN1/GluN3 (71). Contudo, esse receptor funcional é um heterotetrâmero composto por duas subunidades GluN1 e duas subunidades GluN2. A glicina se liga à subunidade GluN1, enquanto o glutamato se liga à subunidade GluN2.

Os dois subtipos principais do receptor NMDA no cérebro adulto, é composto por canais iônicos GluN1-GluN2A e GluN1-GluN2B. Em sinapses, a subunidade GluN2A é expressa principalmente no botão sináptico, enquanto a subunidade GluN2B encontrada na região extrassinapse. Estudos anteriores indicaram que os receptores NMDA extrassinápticos, compostos predominantemente pelas subunidade GluN1 e GluN2B, são responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} envolvido na sinalização de morte celular (20). Além disso, pesquisas demonstraram que durante crises de estado de mal epiléptico (do inglês status epilepticus-SE), a subunidade GluN2B está envolvida na morte neuronal. A administração da cetamina nessas circunstâncias foi capaz de moderar as crises epilépticas e prevenir a morte neuronal (72). Com base nessas evidências, a subunidade GluN2B surge como um alvo terapêutico promissor

na busca por antagonistas específicos do receptor NMDA, visando o tratamento da morte neuronal.

2.3 Tratamento farmacológico para a epilepsia

Uma droga antiepileptica (DAE) é um fármaco que, quando administrado por um período determinado, tem a capacidade de reduzir a frequência ou intensidade das crises em pacientes diagnosticados com essa patologia (73). O tratamento farmacológico da epilepsia geralmente envolve o uso de medicamentos sintéticos como diazepam, valporato semissódico, fenitoína, carbamazepina e lamotrigina (74,75), Figura 2.4. Em alguns casos, intervenções cirúrgicas também podem ser consideradas.

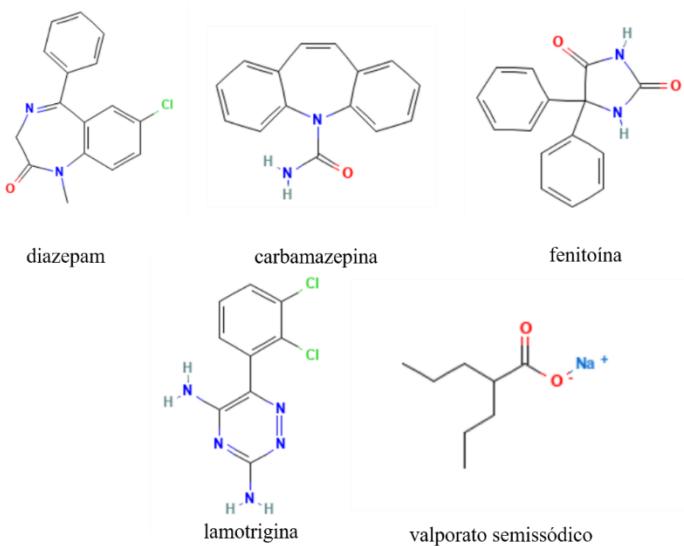


Figura 2.4. Estrutura química do diazepam, carbamazepina, fenitoína, lamotrigina e valporato semissódico utilizados no tratamento da epilepsia

A escolha do medicamento depende das características individuais do paciente, como idade, sexo, potencial de procriação, comorbidades, problemas de tolerabilidade, tipos de crise, características dos anticonvulsivantes, interações e eventos adversos (76). Os principais mecanismos de ação das DAEs incluem o aumento da neurotransmissão GABAérgica e o bloqueio da neurotransmissão excitatória mediada pelo glutamato (77).

Os fármacos antiepilépticos são tradicionalmente classificados em três gerações. A primeira geração abrange os medicamentos comercializados de 1857 a 1957, como brometo de potássio, o fenobarbital e várias moléculas derivadas da estrutura dos barbitúricos, como a fenitoína e primidona. A segunda geração compreende fármacos quimicamente diferentes dos barbitúricos, como carbamazepina, valproato e benzodiazepínicos, que foram introduzidos entre 1960 e 1975.

Os BDZs como diazepam, clonazepam, flurazepam, alprazolam, bromazepam, lorazepam, midazolam e triazolam constituem um grupo de fármacos potente e de grande importância, amplamente prescritos na prática clínica. Eles apresentam ação ansiolítica, relaxante musculares, hipnóticos-sedativo, anticonvulsivantes e são utilizados no tratamento adjuvante na depressão e esquizofrenia (78,79). Esses fármacos atuam em todo sistema nervoso central (SNC) por meio da modulação da transmissão sináptica inibitória através do receptor ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABA_A) (80).

A primeira utilização dos BDZs no tratamento da epilepsia ocorreu em 1965, quando Henry Gastaut administrou por via intravenosa para controlar o estado de mal epiléptico, estado caracterizado por atividade convulsiva continua ou por uma série de crises sem recuperação da consciência (81). Devido a sua alta lipossolubilidade e rápida penetração no SNC, os BDZs apresentam vantagens farmacocinéticas significativas.

Os ligantes dos sítios ativos dos BDZs, ao contrário do GABA ou agonistas GABA, não ativam diretamente os receptores GABA_A, mas apenas modulam alostericamente a ação induzida pelo neurotransmissor inibitório, aumentando a frequência de abertura do canal. Isso resulta na hiperpolarização das membranas pós-sinápticas, reduzindo a excitabilidade neuronal (82).

No entanto, o uso clínico dos BDZs no tratamento de distúrbios convulsivos é severamente limitado pela tolerância, restringindo sua utilidade a longo prazo. A exposição crônica a esses fármacos está associada ao desacoplamento dos sítios de ligação do GABA e dos BDZs, o que sugere uma diminuição na capacidade de interação entre a proteína e a molécula com a qual normalmente interagem, ou a alteração na composição das subunidades do receptor e/ou na função do receptor (83). Isso leva a uma redução na inibição sináptica mediada pelo GABA_A (78,84).

Os fármacos da terceira geração, desenvolvidos após 1980, apresentam uma característica distinta: foram descobertos pelo planejamento racional de fármacos, como a progabida, a gabapentina, a vigabatrina, tiagabina, lamotrigina e o topiramato (85).

Um caso particular de epilepsia que merece atenção devido a seus efeitos adversos é o SE, ocorrendo devido à falha nos mecanismos responsáveis pela interrupção das crises epilépticas ou pela ativação de mecanismos que levam a convulsões prolongadas de maneira anormal. Essa condição pode resultar em consequências a longo prazo como morte neuronal, lesões e alterações nas redes neuronais, dependendo da natureza e duração das crises convulsivas (86). Estudos têm descritos que anticonvulsivantes de primeira e segunda geração, como fenitoína e benzodiazepínicos são refratários a esse tipo de convulsão, em cerca de um terço da população (87), ressaltando a necessidade de novas abordagens farmacológicas.

Além dos receptores GABA_A como alvo, muitos fármacos atuam como antagonistas do NMDA, como a memantina, AP5 (Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanoico), MK-801 e cetamina, que bloqueiam um sítio específico do canal iônico quando o receptor está ativado. A cetamina, em particular, tem mostrado potencial como tratamento adicional para o estado epiléptico refratário, especialmente em pacientes com alto risco de mortalidade devido à resistência aos tratamentos convencionais (88). Além disso, receptores antagonistas do NMDA podem proteger neurônios contra danos induzidos por convulsões e o desenvolvimento de epilepsia (89). Como um antagonista não competitivo, a cetamina reduz a entrada de íons no neurônio e a excitabilidade neuronal, o que é benéfico para a diminuição das crises epilépticas (90).

Apesar da diversidade atualmente de medicamentos disponíveis para o tratamento das crises epilépticas, cerca de 25-45% dos pacientes não respondem bem ao medicamento utilizado no tratamento, sendo insuficientes para o controle das crises convulsivas). (24), resultando em controle e prevenção insuficiente das crises. Além disso, esses fármacos podem estar associados a efeitos colaterais adversos, como dependência física e psicológica (91) tontura, irritabilidade (76). Esses efeitos podem dificultar a adesão ao tratamento e agravando o quadro clínico dos pacientes. Nesse sentido, há uma necessidade urgente de investigar novos agentes

antiepilepticos que sejam mais acessíveis, apresentem menos efeitos nocivos e mais eficazes.

2.4 Uso de plantas medicinais e fitoterápicos

A utilização de plantas para fins terapêuticos na prevenção e tratamento de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade (92). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), uma planta é considerada medicinal quando contém substâncias capazes de tratar ou aliviar doenças, sintomas ou condições de saúde, e é reconhecida pela população devido à sua tradição de uso. Os medicamentos derivados exclusivamente de plantas medicinais são conhecidos como fitoterápicos, e podem ser encontrados em diversas formas, como comprimidos, cápsulas, xaropes, cremes, entre outras apresentações (93).

O conhecimento tradicional sobre as propriedades biológicas das plantas é transmitido de geração em geração, desempenhando um papel fundamental na pesquisa por moléculas bioativas (92). Embora, historicamente, as plantas medicinais tenham sido utilizadas principalmente em suas formas simples, como macerações, infusões e chás, a demanda por medicamentos mais sofisticados aumentou nos séculos XVI e XVII, justificado a necessidade de avanços nesse campo (94).

A medicina popular, fundamentada no uso de produtos naturais para fins terapêuticos, tem experimentado um crescimento significativo ao longo dos anos. Estudos e investigações rigorosas têm sido realizados para explorar possíveis curas e tratamentos para diversas doenças. A química de produtos naturais, especialmente no contexto nacional, tem promovido colaborações eficazes e abrangentes, possibilitando abordagens de desafios com estratégias inovadoras (95). A diversidade da flora brasileira, rica em plantas com propriedades terapêuticas, oferece um vasto potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos de alto valor (96). Essa área de pesquisa tornou-se um foco prioritário na busca por soluções eficazes para diversas patologias.

A fitoterapia é uma abordagem terapêutica que utiliza plantas medicinais em diversas preparações, oferecendo uma opção complementar e integrativa para atender às necessidades de saúde (97). No Brasil, duas políticas nacionais incentivam sua implementação: a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

(PNPMF) (98) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (99), ambas instituídas em 2006. Essas políticas têm promovido discussões sobre oportunidades, importância, desafios, facilidades, vantagens, acesso seguro, uso racional da fitoterapia nos serviços de saúde do SUS.

Segundos dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% das populações dos países em desenvolvimento recorrem à medicina alternativa para resolver problemas básicos de saúde (99). Isso tem motivado pesquisas sobre a viabilidade terapêutica de plantas tradicionalmente utilizadas, além de ser uma alternativa com menor custo em comparação ao desenvolvimento de novos medicamentos baseados em moléculas bioativas (93).

A descoberta e o isolamento de alcaloides de plantas, como a papoula, e o isolamento de glicídios, no século XIX, trouxeram uma nova perspectiva sobre o conhecimento e uso de plantas medicinais, marcando o início da farmácia viva (94,100).

Estudos demostram que extratos, óleos essenciais e compostos isolados de diversas plantas possuem propriedades terapêuticas, incluindo potencial anticâncer (101) antidepressivo (102), antiviral (103) e anticonvulsivante (104).

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de compostos voláteis e lipossolúveis obtidos de material vegetal (105). Eles são amplamente utilizados na medicina tradicional devido às suas propriedades terapêuticas, como anticonvulsivantes (35), ansiolíticos (106), antidepressivos (107).

Considerando a ampla utilização de plantas medicinais e fitoterápicos, é fundamental lembrar que nem todo extrato vegetal é seguro para consumo humano. A segurança e eficácia no uso de uma planta medicinal dependem da identificação correta da planta, da parte utilizada, do modo de preparo, da forma de uso e da dosagem. Essas variáveis são essenciais para evitar riscos toxicológicos, especialmente porque algumas plantas, apesar do seu uso histórico, podem apresentar potências toxídades (108,109).

2.4.1 Espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth

A família Euphorbiaceae é uma das mais extensas entre as angiospermas, abrangendo cerca de 300 gêneros e mais de 8000 espécies. Destaca-se nessa família o gênero Cróton, que engloba aproximadamente 1300 espécies distribuídos em regiões tropicais ao redor do mundo (110), com 300 delas presentes em todos os domínios fitogeográficos do Brasil. No nordeste brasileiro, são encontradas cerca de 110 espécies dessa família.

O gênero Croton possui um grande potencial econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido à presença de diversos metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides e terpenoides, saponinas e taninos, além de um rico conteúdo de óleos essenciais. Esses compostos conferem propriedades terapêuticas a várias espécies, evidenciando sua relevância na pesquisa farmacológica e os efeitos biológicos que exercem sobre os seres humanos (111). Entre as espécies desse gênero, destaca-se a *Croton heliotropiifolius* Kunth, popularmente conhecida como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro. Essa planta é amplamente encontrada em áreas geográficas como Caribe, Venezuela, Peru, Bolívia e Brasil. No Brasil, é uma planta endêmica no nordeste, sendo comumente encontrada em estados como Alagoas, Bahia, Ceará, Piauí, Sergipe, Rio Grande do Norte, como também no Centro-Oeste e sudeste do país, Figura 2.5.



Figura 2.5. Arbustos do *C. heliotropiifolius* Kunth.

Essa espécie pode ser encontrados com frequência na vegetação da caatinga, brejos, campus rupestres e cerrados (26,112).

Os arbustos do *C. heliotropiifolius* medem cerca entre 0,7 e 2,5 metros de altura, apresentando um hábito predominante arbustivo. A seiva é transparente ou alaranjada, e a planta é por uma estrutura cobertura tomentosa. Seus ramos têm coloração verde-cinzenta e suas folhas, que variam entre alternadas e opostas nas extremidades dos ramos, são pilosas. As folhas exalam um cheiro agradável devido à presença de óleos essenciais. A inflorescência é solitária, encurvada e de cor branca, contendo flores estaminadas a pistiladas. As folhas estaminadas são geralmente elípticas, coberta de pelos na parte externa e glabra internamente, enquanto as pistiladas apresentam um curto pedicelo ou podem ser sésseis, com uma textura externamente vilosa e internamente pubescente, sem pétalas visíveis. As estruturas vegetativas e reprodutivas possuem tricomas estrelado-porrectos densamente distribuídos. O fruto é uma cápsula verde quando imaturo e se torna preta ao amadurecer, contendo 3 sementes. Além disso columela do fruto é tripartida no ápice após a deiscência do fruto. A florescência ocorre de maio a novembro, enquanto a frutificação se dá entre maio e junho ao passo que os frutos ocorrem entre maio e junho (113,114).

O uso de *C. heliotropiifolius* na medicina popular está relacionada às suas propriedades medicinais atribuídas ao gênero. Essa espécie é frequentemente utilizada na medicina tradicional na forma de chás, infusões, extratos, sendo empregada no tratamento de doenças contra câncer, diabetes, inflamação, malária, gripe, feridas e febres (115,116). Estudos etnobotânicos também indicam seu uso para o tratamento de alergias, anemia, distúrbios gastrointestinais, coceira, dor de cabeça, dor de estômago/diarreia, dor nas costas, rachaduras nos pés e tosse (117). Atualmente, essa espécie é reconhecida por suas ações inseticidas, larvicida (118), antimicrobiano (119), anti-inflamatória (120), doenças parasitárias (121), anticonvulsivante (35), antioxidante e antifúngica (122).

Compostos de origem natural, principalmente das classes dos flavonoides, terpenoides, fenóis e álcoois poliacetilênicos, têm sido associados à modulação dos receptores ianotrópicos GABA_A (62). Estudos demostram que o ácido valerênico, presente na planta *Valeriana officinalis*, atua nos sistemas GABA do cérebro, interagindo com subunidades específicas no receptor GABA_A de maneira semelhante aos BDZs (123,124). Além disso, sesquiterpenos também foram relatados por inibirem

a enzima GABA transaminase, resultando em efeitos sedativos e tranquilizante causado pelo aumento do mediador no Sistema Nervoso Central (125).

C. heliotropifolius apresenta uma riqueza de compostos biologicamente ativos, resultante de seu conteúdo de óleos essenciais, que apresentam uma composição complexa e odor forte. Estudos científicos já reportaram várias atividades terapêuticas do óleo essencial e dos extratos do *C. helliotropifolius*, como ação larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (118), atividade inseticida do extrato etanólico contra *Sitophhilus zeamais* (126), efeito inibidor do extrato etanólico da casca do caule contra acetilcolinesterase *in vitro* e atividade antifúngica contra *cândida albicans* (127). Uma investigação etnobotânica realizada na chapada do Araripe (Ceará, Brasil), revelou que o extrato aquoso das raízes da *C. heliotropifolius* possui propriedades antioxidantes e antifúngicas, associadas à sua baixa citotoxicidade (122).

Um estudo com o óleo essencial de *Croton zehntneri* demonstrou um aumento no limiar para o surgimento das convulsões mínimas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (35). Ngo Bum e colaboradores (2012) mostraram que a decocção da casca de *C. macrostachyus* apresenta atividade anticonvulsivante e sedativa em modelos de camundongos induzidos por diferentes convulsivantes (128). Esses dados sugerem um potencial anticonvulsivante para plantas desse gênero.

A composição química do óleo essencial de *C. heliotropifolius* pode variar conforme as condições do solo e do clima do local de colheita. Alencar e Filho et.al (2017) realizaram estudo com o óleo das folhas dessa espécie coletada na localidade Caboclo, município de Afrânia, Pernambuco, Brasil, e relataram variações na composição química do óleo essencial e sua atividade antibacteriana. Os compostos químicos identificados foram consistentes nas quatro estações (verão, outono, inverno e primavera), embora em proporções diferentes, com os principais constituintes sendo beta-cariofileno, biciclogermacreno, germacreno-D, limoneno e 1,8 cineol (119).

Lopes e colaboradores (2022) realizaram um estudo com o óleo essencial das folhas dessa espécie e identificaram, por meio de cromatografia gasosa (CG), 33 fitoconstituintes, sendo o alfa-pineno (16,7%) e 1,8-cineol (13,81%) os compostos mais abundantes. Nesse estudo, também foi observada a citotoxicidade do óleo em concentrações de 0,32, 1,6 ou 200 µg/ml utilizando o modelo de *Allium cepa* (32). Neves e Câmara (2012), ao usar CG e cromatografia gasosa-espectrometria de

massas, identificaram que o trans-cariofileno como o principal constituinte do óleo essencial das folhas dessa espécie (129).

Em um estudo recente, foi identificado a presença de 33 fitoconstituintes no óleo essencial das folhas dessa espécie, incluindo monoterpenos de hidrocarbonetos com a predominância do α -pineno (16,7%), limoneno (5,89%) e β -felandreno (5.89); monoterpenos oxigenados com o 1,8-cineol (13.81%); sesquiterpenos hidrocarbonetos com predominância do trans-cariofileno (6.46%) e biciclogemacreno (9.44%); e sesquiterpenos oxigenados com predominância do espatulenol (4.89%). Na Tabela 2.1, estão listados todos os compostos identificados no óleo essencial das folhas de *C. heliotropifolius*

Tabela 2.1. Compostos identificados no óleo essencial das folhas de *C. helliotropifolius* Kunth.

Nº	Compostos
Monoterpenos Hidrocarbonetos	
1	α-tujeno
2	α -pineno
3	Sabineno
4	β- pineno
5	Mirceno
6	α-felandreno
7	(+) - careno-3
8	α-terpineno
9	ρ-cimeno
10	Limoneno
11	β-felandreno
12	γ-terpineno
13	α-terpinoleno
Monoterpenos Oxigenados	
14	1,8- cineol
15	Linalol
16	Iso-borneol
17	Terpineno-4-ol
18	(-) α-terpineol
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	
19	β-bourboneno
20	β- elemeno
21	β – iso-comeno
22	Trans-cariofileno
23	Guaiadieno (6.9)
24	α – humuleno
25	Epi-trans-cariofileno
26	Germacreno-D
27	Biciclogemacreno
28	α-bulneseno
29	δ-cadineno
Sesquiterpenos Oxigenados	
30	Germacreno-B
31	Espatulenol
32	Óxido cariofileno
33	Iso-espatulenol

Adaptada (Marques, et.al 2023)

Neste trabalho, foi realizado o teste ADMET onde foram obtidos parâmetros toxicológicos de todos os constituintes para caracterizar o potencial farmacológico. Por meio do estudo *in silico* foi demonstrado que todos os constituintes apresentaram alta absorção oral, média permeabilidade celular e alta permeabilidade no sistema sanguíneo cerebral, Tabela 2.6. Os resultados de toxicidade evidenciaram que todos os compostos exibiram baixo a médio risco de toxicidade, e o teste de mutagenicidade não mostrou alterações significativas no número de micronúcleos (MN) (130). Essas descobertas sugerem que o óleo essencial dessa planta pode ser um candidato promissor para o desenvolvimento de novos fármacos.

Tabela 2.2. Avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) dos 33 constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropifolius* Kunth.

	Absorção		Distribuição			Metabolismo					
	HIA (%)	Pcaco-2 (nm/sec)	MDCK	PPB (%)	BBB	CYP2C19 inibição	CYP2C9 inibição	CYP2D6 inibição	CYP2D6 substrato	CYP3A4 inibição	CYP3A4 substrato
α-tujeno	100	23.632	304.815	100	5.533	N	I	N	N	I	S
α-pineno	100	22.319	287.643	100	6.353	N	I	N	N	I	S
Sabineno	100	23.492	300.517	60.971	5.756	N	I	N	N	I	S
Mirceno	100	23.630	216.252	100	9.101	I	I	N	N	N	S
α-felandreno	100	23.416	267.707	100	7.170	I	I	N	N	N	W
(+)-carene-3	100	23.631	304.815	100	5.533	N	I	N	N	N	S
α-terpineno	100	23.640	244.909	100	8.037	I	I	N	N	N	S
p-cimeno	100	23.433	237.507	100	4.969	I	I	N	N	I	W
Limoneno	100	23.631	230.434	100	8.278	I	I	N	N	N	S
β-felandreno	100	23.415	261.534	91.196	7.409	I	I	N	N	N	W
Gamma-terpineno	100	23.640	244.909	100	8.037	I	I	N	N	N	S
Terpinoleno	100	23.492	221.545	93.161	8.904	I	I	N	N	N	S
β-pineno	100	23.492	300.517	100	5.756	N	I	N	N	I	S
1,8-cineol	100	21.895	233.718	100	1.467	N	I	N	N	I	W
Linalol	100	29.355	115.421	100	6.125	I	I	N	N	N	W
Isoborneol	100	24.234	91.738	100	3.805	N	I	N	N	I	S
Terpin-4-ol	100	50.807	60.292	100	5.539	N	I	N	N	N	W
α-terpineol	100	50.808	191.284	23.416	5.119	I	I	N	N	N	W
β-bourboneno	100	23.492	41.963	94.602	11.363	N	I	N	N	I	S
β-elemeno	100	23.491	56.871	100	13.435	N	I	N	N	N	S
β-isocumeneno	100	23.432	13.066	66.671	3.966	I	I	N	N	I	N
Epi-trans-cariofileno	100	23.631	56.216	100	13.319	I	I	N	N	N	S
Guaiadieno	100	23.635	59.372	100	13.926	I	I	N	N	I	S
α-humuleno	100	23.633	60.685	100	14.221	I	I	N	N	N	S
Germacreno-D	100	23.631	61.859	100	14.517	I	I	N	N	N	S
Germacreno-B	100	23.637	64.67	100	15.433	I	I	N	N	N	S
Bicidlogermacreno	100	23.633	55.138	100	13.135	N	I	N	N	N	S
α-bulneseno	100	23.491	60.136	100	14.094	I	I	N	N	I	S
Delta-cadineno	100	23.639	59.372	100	13.926	I	I	N	N	N	S
Trans-cariofileno	100	23.631	56.216	100	13.319	I	I	N	N	N	S
Espatulenol	100	54.424	227.907	82.888	6.966	N	I	N	N	I	S
óxido de cariofileno	100	56.347	218.885	90.849	3.752	N	I	N	N	I	S
Isoespatulenol	100	54.349	221.794	98.288	7.398	N	I	N	N	I	S

Legenda: HIA (Absorção Intestinal Humana); PCaco-2 (permeabilidade em células Caco-2); MDCK (permeabilidade em células de rim canino Madin-Darby); BBB (penetração na barreira hematoencefálica); PPB (Ligaçao a proteínas plasmáticas). Siglas: N = não; I = inibidor; S = substrato; W = fraco.

Adaptada (Marques, et.al 2023)

Os fitoconstituintes descritos nesse trabalho são amplamente encontrados em óleos essenciais de diversas plantas e exibem importantes propriedades biológicas quando isolados. Estudos demostram que o α -pineno e o limoneno possuem notável ação anticâncer (74). Além disso, o β -felandreno apresenta atividade antimicrobiana específica contra determinados micro-organismos (131), enquanto o biciclogemacreno demonstra atividade antifúngica (132). O 1,8-cineol e o espatulenol são reconhecidos por suas significativas propriedades anti-inflamatórias (33,133). Já o trans-cariofileno, tem se mostrado relevante para atividades anticonceptivas e antidepressiva (134,135).

Além disso, estudos experimentais indicam que alguns desses fitoconstituintes apresentam ação anticonvulsivante significativa, como o α -terpineol (136) e linalol (137). Estudos mostraram que o α -pineno foi responsável pela indução de efeitos anticonvulsivantes em um modelo PTZ em ratos (138). Outro estudo demonstrou que terpineno-4-ol protegeu camundongos contra convulsões induzidas pelo modelo de convulsão por máximo eletrochoque (MES) (139). O limoneno também tem sido associado à eficácia no combate a doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, doença de Parkinson, enxaqueca, depressão e epilepsia (140).

Pesquisas indicam que o limoneno, quando administrado em conjunto com o diazepam (um medicamento anticonvulsivante), potencializa a atividade anticonvulsivante do diazepam, sugerindo um mecanismo de ação semelhante (141). Em outro estudo, foi sugerido que os altos índices de 1,8-cineol presentes no óleo essencial da *Elettaria Cardamomum* retardam o início das convulsões induzidas por PTZ (142). Oliveira et al (2016) mostraram que o trans-cariofileno possui efeitos anticonvulsivantes, aumentando a latência para convulsões sem efeitos adversos, sugerindo seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos antiepilepticos (143) .

2.5 Técnicas computacionais aplicadas no desenvolvimento de fármacos

2.5.1 Docking molecular

O design de fármacos assistido por computador (CADD–Computer-Aided Drug Design) otimiza a obtenção de resultados na descoberta de novos fármacos de forma eficiente, econômica e ágil, acelerando a identificação de compostos promissores e facilitando a seleção para pesquisa experimentais (144). Entre as técnicas empregadas pelo CADD, o docking molecular se destaca por sua eficiência e pela capacidade de reduzir o tempo na obtenção de resultados, especialmente quando comparado a métodos experimentais que envolvem custos mais elevados (com pessoas, materiais) e demandam mais tempo de pesquisas.

Introduzido por Kuntz et al. na década de 1980, o docking molecular, ou ancoragem molecular, é uma ferramenta amplamente utilizada (145). Essa abordagem baseada na estrutura desempenha um papel crucial em prever a conformação (pose) e a afinidade de ligação de uma molécula candidata a fármaco no sítio de ligação específico de um alvo farmacológico. Essas interações podem, por sua vez, desencadear uma série de efeitos colaterais observados nos estudos *in vivo* subsequentes (146). Além disso, as interações entre molécula e o alvo podem prever a ativação ou inibição de proteínas, apoiando o desenvolvimento de novos fármacos (147).

As conformações *in silico* de complexos proteína-ligante ou proteína-proteína têm sido comparadas às obtidas através da cristalografia de raios-X, microscopia eletrônica ou ressonância magnética nuclear, disponíveis em bancos de dados como Proteína Data Bank (PDB) ([RCSB PDB: Homepage](#)) e Worldwide Protein Data Bank ([wwPDB: Banco Mundial de Dados de Proteínas](#)). A disponibilidade de suas estruturas 3D fornece informações valiosas para o design e descoberta de medicamentos baseados em estrutura, contribuindo para o aumento do conhecimento sobre a atividade biológica, estrutura e inibição.

Além disso, existem bancos de dados específicos que disponibilizam estruturas de complexos binários e informações sobre suas afinidades de ligação, como em PDDBIND ([PDBbind+](#)), AffinDB (148) e BindDB ([Binding Database Home](#)). Também

existem repositórios dedicados a pequenas moléculas, como PubChem ([PubChem](#)), ZINC ([ZINC Browser](#)), ChemDB ([ChemDB Web Interface Index](#)), e DrugBank ([DrugBank Online | Database for Drug and Drug Target Info](#)), que juntos contêm mais de um milhão de estruturas de ligantes potenciais. Esses dados oferecem um vasto leque de informações para o desenvolvimento de algoritmos de docking e validação de resultados (149).

Muitas dessas macromoléculas são alvos terapêuticos promissores, e o acesso às suas estruturas em 3D proporciona oportunidades sem precedentes para o design e a descoberta de medicamentos baseados em estrutura. A capacidade e a velocidade do docking molecular em filtrar extensas bibliotecas de compostos e identificar ligantes candidatos para um alvo proteico tornam essa técnica de triagem virtual extremamente relevante.

A triagem normalmente ocorre em três etapas: Inicialmente, o programa de docking molecular prevê diferentes orientações e conformações da molécula ligante em relação à receptora utilizando algoritmos de buscas. Em seguida, a função escore é aplicada aos possíveis modos de ligação propostos pelo algoritmo e os complexos são pontuados de acordo com a energia de ligação. Finalmente, as conformações são classificadas com base em sua energia de ligação, e as que apresentarem menor energia são selecionadas (150). Teoricamente, a molécula com a menor energia de ligação ao sítio ativo é a mais propensa a apresentar atividade biológica efetiva (151).

Uma metodologia de docking bem-sucedida deve prevê com exatidão a pose de um ligante no sítio do receptor o mais próximo do experimental e prevê as interações intermoleculares envolvidas. Assim, os resultados do docking podem direcionar a otimização racional de compostos líderes acelerando a descoberta de fármacos. Exemplos notáveis incluem a combinação de docking molecular e avaliação experimental, que acelerou a descoberta da rilpivirina, um inibidor da transcriptase reversa do HIV (152) e o design racional assistido por computador, que permitiu o desenvolvimento de inibidores potenciais contra influenza (153).

Dentre os vários software de docking disponível, como MCDOCK(154), GOLD (155), Autodock Vina (156), cada um utiliza algoritmos avançados e diferentes campos de força. Dada a diversidade de softwares de docking molecular, nenhum deles é universalmente aplicável. Portanto, a escolha do programa deve considerar fatores

como disponibilidade, necessidades específicas do sistema e capacidade computacional, além da complexidade do alvo molecular.

A exatidão dos resultados de docking molecular depende de fatores como a seleção precisa de locais de ligação e poses adequadas, exigindo uma avaliação cuidadosa. Para garantir resultados confiáveis, é fundamental compreender as limitações dos métodos de docking, escolher abordagens adequadas e interpretar os resultados de forma crítica (151).

A predição dos modos de ligação e afinidade de compostos ao sítio ativo de uma proteína é um dos principais desafios no desenvolvimento de fármacos baseados em estrutura. Para superar esse desafio, foram desenvolvidos algoritmos capazes de reproduzir com eficiência a orientação de ligantes observada experimentalmente por técnicas como cristalografia de raios-X. A comparação entre o modo de ligação cristalográfico (experimental) e o obtido pelo docking é feita através do cálculo do desvio quadrado médio (RMSD), que deve ser inferior que 2,0 Å (157), garantindo resultados confiáveis. A equação utilizada para essa comparação é a seguinte (158) :

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^N d_i^2} \quad (1)$$

Onde N é o número de átomos no ligante e d_i^2 é a distância euclidiana entre o i -ésimo par de átomos correspondentes.

2.5.1.1 Algoritmos de busca

As ferramentas essenciais em uma metodologia de docking incluem duas etapas principais: primeiro, a escolha do algoritmo de busca, que deve ser capaz de reproduzir o modo de ligação mais próximo do experimental (159); segundo, a função de pontuação, que classifica as melhores poses com base na energia de ligação (144).

Durante o processo de docking, diversos parâmetros, obtidos a partir das coordenadas de entrada do receptor e do ligante, podem ser considerados na busca pela conformação ideal. Esses parâmetros incluem a complementaridade geométrica, relacionada ao raio e à carga atômica de van der Waals, a flexibilidade da estrutura

do receptor ou do ligante, e as interações interatômicas, como ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos (149).

Explorar de maneira abrangente todo o espaço de busca para capturar todas as conformações possíveis, além de realizar translações e rotações de uma molécula em relação a uma proteína dentro de um tempo limitado, tem se mostrado desafiador com os recursos computacionais atuais. Para enfrentar essa dificuldade, os programas de docking utilizam os algoritmos de busca, que são um conjunto de regras e parâmetros aplicados para explorar a flexibilidade da estrutura dos ligantes durante as simulações abrangendo todo o cenário de energia livre para identificar as melhores poses dos ligantes (6).

As primeiras abordagens no desenvolvimento de algoritmos de busca consideravam tanto a proteína como os ligantes como estruturas rígidas, focando apenas a complementaridade, e assim, reduzindo a demanda computacional. No entanto, devido às limitações apresentadas, muitos programas de docking evoluíram para considerar a flexibilidade do sistema, permitindo uma busca mais flexível do complexo ligante-proteína (149).

As abordagens de acoplamento flexível podem ser categorizadas da seguinte maneira: (1) receptor totalmente rígido, enquanto o ligante apresenta translação e rotação de corpo rígido; (2) receptor totalmente rígido e o ligante completamente flexível, incluindo graus de liberdade associados aos ângulos diedrais das ligações simples; e (3) receptor parcial ou totalmente flexível e o ligante totalmente flexível. Quanto à exploração conformacional do ligante, os algoritmos de busca podem ser agrupados em três categorias: 1) randônicos, 2) sistemáticos e 3) baseados em simulação.

Os algoritmos randônicos operam realizando mudanças aleatórias explorando diversas conformações possíveis, nessa categoria inclui-se as simulações de Monte Carlo (MC) (154)e os algoritmos genéticos (GA) (155) (6). O algoritmo de busca de MC, incorporado no programa MCDOCK (154), permite a movimento dos ligantes e dos alvos, realizando a adaptação do ligante ao receptor através de muitas posições e rotações aleatórias, minimizando as chances de ficar preso nos mínimos locais (6).

Os GAs têm como objetivo encontrar a conformação mais próxima do mínimo de energia global (149). Baseados nos princípios da genética natural, esses algoritmos utilizam a ideia de que a sobrevivência dos indivíduos mais aptos pode ser

uma ferramenta eficaz na busca por soluções em problemas de otimização. Os GAs operam com uma estrutura de codificação que se assemelha ao DNA, permitindo simular operações genéticas, como mutações e recombinações. A interação específica entre um ligante e uma proteína pode ser descrita por um conjunto de valores que definem a tradução, orientação e conformação do ligante em relação à proteína. Estas variáveis de estado do ligante correspondem a diferentes genes (160) (161). Esse algoritmo é utilizado por programas como GOLD (162), Autodock Vina (163). Programas como AUTODOCK emprega o algoritmo genético Lamarckiano (LGA), alternando entre "espaço genotípico" e "espaço fenotípico" (161).

Por outro lado, os algoritmos sistemáticos, que incluem o algoritmo de construção incremental, exploram os graus de liberdade das moléculas por meio de construção incremental no sítio receptor. Esse método geralmente começa com a colocação de um fragmento âncora no alvo molecular, seguido pela adição sucessiva dos fragmentos restantes até que a molécula inteira seja reconstruída em relação ao receptor (6). Nesse método o ligante é dividido em fragmentos que são encaixados individualmente no receptor. Após a inserção, esses fragmentos se fundem, permitindo que o algoritmo leve em consideração a flexibilidade do ligante. Esse processo resulta na construção gradual do ligante no sítio ativo de receptor (149,164). Programas de docking, como o FLEXX, utilizam esse algoritmo para realizar simulações precisas (164).

Para análises mais detalhadas em nível atômico das interações proteína-ligante, e para explorar todos os graus de liberdade do sistema, possibilitando a exploração da energia livre, os algoritmos de simulação são empregados, sendo a dinâmica molecular a estratégia mais utilizada. Esse método também permite a inclusão de moléculas de solvente, o que é essencial para compreender o papel da água no docking e na estabilidade do sistema (165). No entanto, embora essa abordagem ofereça flexibilidade do sistema, seu alto custo computacional pode restringir o tempo disponível para a execução das simulações. Alguns programas de docking baseados em dinâmica incluem QXP (166) e ICM (167).

2.5.1.2 Funções de pontuação

As funções de pontuação são métodos matemáticos utilizados para prever a afinidade de ligação entre duas ou mais moléculas. Por meio de algoritmos de buscas, os programas de docking geram diversas poses de ligação preferencial de um ligante em relação a um alvo molecular. Cada uma dessas poses é avaliada por funções de pontuação, que classificam os resultados com base nas energias de ligação estimadas, permitindo assim a identificação das conformações mais favoráveis e a predição da afinidade de ligação entre o ligante e o receptor (168).

Para a confiabilidade nas previsões feitas pelas funções de pontuação, três aspectos devem ser considerados: (1) capacidade de pontuação, refere-se à habilidade de um método de docking em atribuir pontuações que refletem com precisão a energia de ligação entre um ligante e um receptor, correlacionando-se com dados experimentais; (2) capacidade de classificação, que se refere a habilidade de categorizar diferentes ligantes com base em sua energia de ligação; (3) capacidade de encaixe, que refere-se à habilidade de identificar a pose nativa de um ligante e gerar diversas poses correlacionadas, que são posteriormente avaliadas pelo algoritmo de pontuação em termos de energia de ligação. Enquanto o algoritmo de encaixe é responsável por gerar essas poses, o algoritmo de pontuação avalia a energia de ligação associada a cada uma delas, permitindo identificar a pose mais estável e energeticamente favorável (144,168).

Embora não exista uma função de pontuação universalmente aplicável a todos os sistemas, essas funções permanecem como a principal alternativa de baixo custo computacional para prever as energias de ligação nos estudos de docking molecular.

As funções de pontuação mais frequentemente utilizadas pelos programas de docking podem ser classificadas em três categorias: (1) empíricas, (2) baseadas em campos de força de mecânica molecular e (3) baseadas em conhecimento (169). Muitos programas utilizam combinações de duas ou mais funções de pontuação.

As funções de pontuação empírica ao contrário dos campos de força, que são derivados de princípios fundamentais, são desenvolvidas por meio de calibração direta com um conjunto de complexos de proteína-ligante com estruturas e afinidades de ligação determinadas experimentalmente, utilizando análise de regressão multivariada. Essas funções estimam a afinidade de ligação de um complexo com

base em um conjunto de termos de energia ponderados que pode ser decomposta em componentes básicos, que podem ser conceitualmente descritos como (170):

$$\Delta G_{ligação} = \Delta G_{vdm} + \Delta G_{H-ligação} + \Delta G_{deformação} + \Delta G_{hidrofobicidade} + \Delta G_0 \quad (2)$$

Onde, ΔG_{vdm} representa a interação de van der Waals entre o ligante e a proteína; $\Delta G_{H-ligação}$ corresponde à contribuição das ligações de hidrogênio entre o ligante e a proteína; $\Delta G_{deformação}$ contabiliza o efeito de deformação; $\Delta G_{hidrofobicidade}$ conta o efeito hidrofóbico. ΔG_0 é a constante de regressão.

Alguns funções de pontuação do tipo empírica, incluem SCORE1 que leva em consideração quatro termos de energia: ligações de hidrogênio, interações iônicas, interações lipofílicas entre proteína e ligante, e o número de ligações rotativas no ligante (171). Já a função de ChemScore considera ligações de hidrogênio, a participação dos átomos metálicos, efeitos lipofílicos dos átomos e o número efetivo de ligações rotativas no ligante (172). O programa GOLD implementa uma versão modificada da função ChemScore, incorporando um termo adicional que considera ligações de hidrogênio fracas, as quais são cruciais para determinados eventos de ligação de inibidores de quinase (173). Além disso, a função X-CScore, uma função de consenso que combina ChemScore e Score, considera interações van der Waals, ligações de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e ligações rotativas efetivas (170). Programas de docking como o FlexX (164) utiliza esse tipo de função. O programa Autodock Vina utiliza uma função de pontuação híbrida (empírica + baseada em conhecimento) baseada na função X-Score, que permite classificar as conformações. As funções baseadas em campos de força de mecânica molecular aproximam a energia livre de ligação dos complexos ligante-proteína com base em interações atômicas físicas, incluindo interações de van der Waals (VDW), interações eletrostáticas e forças de estiramento/deformação/torção de ligações (169,174). Essas funções são geralmente mais rápidas nos cálculos de energia de ligação devido à simplicidade de seus termos, em comparação com as funções empíricas.

Embora as simulações que consideram moléculas de solvente sejam ideais, um grande desafio enfrentado pelas funções de pontuação baseadas em campo de força é tratamento adequado do solvente no processo de ligação. Os altos custos

computacionais envolvidos, principalmente devido à inclusão explícita do solvente, limitam significativamente a aplicação dessas funções em triagem de bancos de dados virtuais. Programas de acoplamento, como DOCK (175), implementam funções de pontuação baseadas em campo de força.

Existem também as funções baseadas em conhecimento, que empregam potenciais de energia derivados das informações estruturais incorporadas em estruturas atômicas determinadas experimentalmente para avaliar a afinidade de ligação entre o ligante (176). Esses potenciais pareados são obtidos pela lei inversa de Boltzmann, onde para o estudo de proteína-ligante, pode ser calculada da seguinte forma (169):

$$w(r) = -K_B T \ln[g(r)], g(r) = \rho(r)/\rho^*(r) \quad (3)$$

Onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta do sistema, $\rho(r)$ é a densidade numérica do par de átomos proteína-ligante à distância r , e $\rho^*(r)$ é a densidade do par em um estado de referência sem interações interatômicas (169).

Essas funções assumem que interações favoráveis são mais frequentes do que interações desfavoráveis, e calculam a pontuação final favorecendo contatos preferidos e desfavorecendo interações repulsivas entre átomos do ligante e da proteína dentro de um limite específico (176–178). Quando comparadas às funções baseadas em campo de força e empíricas, as funções baseadas em conhecimento oferecem um bom equilíbrio entre exatidão e velocidade, pois não dependem de cálculos *ab initio* (144). Alguns exemplos funções baseadas em conhecimento são DrugScore (179), M-Score (180) e PMF04 (181).

2.5.2 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

O método DFT, amplamente considerado um dos pilares da química computacional, surgiu como uma alternativa eficiente aos métodos *ab initio* e semi-empírico, para o estudo de propriedades eletrônicas, principalmente no estado fundamental, de sistemas de muitos corpos, como átomos, moléculas e sólidos. A DFT destaca-se pela sua velocidade computacional e menor uso de memória, mantendo uma precisão de cálculo bastante satisfatória (182).

A entidade central da DFT é a densidade eletrônica, que serve como a variável fundamental na descrição de sistemas eletrônicos. Esse método é particularmente útil na análise de sistemas moleculares, permitindo uma representação realista de sistemas orgânicos, inorgânicos, metálicos e semicondutores (183). Além disso, a DFT fornece definições prontas para diversas propriedades de interesse para químicos, como eletronegatividade, dureza, índices de reatividade.

A origem da DFT remontam à década de 1920, quando Thomas (184) e Fermi (185) introduziram a ideia de que a energia do estado fundamental de um sistema de elétrons em movimento sob um potencial externo associado a um referencial nuclear podem ser considerada como funcional único da densidade eletrônica de uma partícula $n(r)$. Essa abordagem substitui as funções de onda pela densidade eletrônica como a variável básica.

No entanto, foi somente em 1964 que Hohenberg e Kohn (186) estabeleceram uma base sólida para a teoria ao apresentar seu primeiro teorema fundamental, que declara que a energia do estado fundamental (E) é determinada exclusivamente pela densidade eletrônica correspondente $\rho(r)$. Com isso, é possível deduzir, a menos de uma constante, o potencial externo em que os elétrons se encontram (187). Em outras palavras, para determinar qualquer propriedade de um átomo, molécula ou sólido, basta conhecer sua densidade eletrônica. Entretanto, o teorema de Hohenberg e Kohn não oferece uma fórmula simples para calcular a densidade do estado fundamental em sistemas de elétrons que não interagem.

Aplicações práticas da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) dependem fundamentalmente do formalismo de Kohn-Sham. Esse esquema substitui o sistema real de elétrons interagentes por um sistema fictício de elétrons não interagentes, que possuem a mesma densidade eletrônica do sistema original, mas se movem em um potencial efetivo (188). Como resultado, esses elétrons não interagentes obedecem à equação de Schrödinger de uma partícula, conhecida como equação de Kohn-Sham (189).

$$\nu_{ks}[\rho](\vec{r}) = \nu_{ext}(\vec{r}) + \nu_{Hartree}[\rho](\vec{r}) + \nu_{xc}[\rho](\vec{r}) \quad (4)$$

O primeiro termo representa o potencial externo, que, em uma molécula ou sólido, é tipicamente gerado pelos núcleos atômicos. O segundo termo, conhecido como potencial de Hartree e já presente na teoria de Thomas-Fermi, considera a interação eletrostática clássica entre os elétrons, ou seja, a interação entre um elétron e a densidade média de carga de todos os elétrons do sistema. Por fim, o último termo, denominado de potencial de troca e correlação, abrange todos os aspectos não triviais dessa interação, tornando-se crucial na determinação das propriedades eletrônicas de átomos, moléculas e sólidos no estado fundamental (189).

A aproximação mais simples para o terceiro termo é a densidade local (LDA, de Local Density Approximation). A LDA se baseia em um modelo idealizado, onde os núcleos atômicos são substituídos por uma carga positiva contínua e constante. Embora essas equações sejam facilmente resolvidas em um computador, e mesmo com sua simplicidade, a LDA proporciona resultados notavelmente melhores. Desde então, inúmeras outras aproximações para o potencial de troca e correlação foram propostas, incluindo aproximações generalizadas de gradientes (GGA) e métodos híbridos, que combinam GGA com Hartree-Fock (189).

A introdução da DFT na química ocorreu de maneira gradual, mas ganhou um impulso significativo com a contribuição do químico inglês John Pople, que integrou a DFT em seu programa de computador GAUSSIAN, amplamente reconhecido como software de Química Quântica mais utilizado no mundo. A DFT revolucionou a forma como estudamos o ambiente ao nosso redor, permitindo que os computadores nos auxiliasssem na compreensão e previsão das propriedades de átomos, moléculas e sólidos. Assim, tornou-se uma ferramenta essencial em áreas diversas, como nanotecnologia, bioquímica e biotecnologia. Em reconhecimento a essas inovações, Walter Kohn e John Pople, foram laureados com prêmio Nobel de Química em 1998 por suas contribuições no desenvolvimento de métodos computacionais aplicados à química quântica (189).

A DFT possibilita o cálculo de uma ampla gama de propriedades moleculares, estabelecendo uma conexão eficiente entre teoria e dados experimentais. Esse método fornece informações valiosas sobre propriedades geométricas, eletrônicas e espectroscópicas dos sistemas em estudo, demonstrando sua capacidade de gerar resultados que facilitam a compreensão de sistemas compostos por muitos átomos

(190). Diante disso, a DFT se tornou uma aliada estratégica na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

Antes de serem lançados no mercado, os fármacos exigem investimentos significativos em pesquisa, que vão desde estudos preliminares com plantas, como a prospecção fitoquímica, até experimentos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a eficácia. Muitas vezes, esses fármacos são descartados devido a resultados indesejáveis, como potenciais efeitos colaterais. Nesse contexto, os métodos computacionais oferecem a vantagem de fornecer resultados a um custo reduzido e em um período de tempo mais curto em comparação com os métodos experimentais, que envolvem custos mais altos (de pessoal, materiais) e demandam um tempo de pesquisa mais prolongado. Apesar das diversas contribuições da DFT, sua eficácia está condicionada à escolha de uma função de base adequada e de funcionais apropriados.

2.5.2.1 Funções de base

Os orbitais atômicos são soluções da equação de Schrödinger quando aplicada a um átomo. Assim, um orbital atômico pode ser descrito como uma função de onda que descreve a localização de um elétron no átomo, indicando onde a probabilidade de encontrá-lo é maior. Quando se utilizam aproximações para determinar a função de onda, o termo "função de onda" é frequentemente substituído por "função de base". Nesse contexto, as funções de base são combinações lineares que formam os orbitais moleculares que consistem em um conjunto de funções matemáticas. Quando combinadas essas funções geram os orbitais moleculares, resultados da combinação linear de orbitais atômicos (CLOA).

Existem dois tipos de funções de base utilizadas em cálculos de estrutura eletrônica: os orbitais atômicos do tipo Slater (STOs) e os orbitais atômicos do tipo gaussiana (GTOs). As funções do tipo Slater foram as primeiras funções de base criadas e têm características importantes, pois se assemelham às funções que solucionam o orbital atômico do átomo de hidrogênio (191), podendo ser escrita da seguinte forma:

$$X_{\xi,n,l,m}(r, \theta, \varphi) = NY_{l,m}(\theta, \varphi)r^{n-1}e^{\xi r} \quad (5)$$

Onde N é uma constante de normalização, as funções são harmônicas esféricas usuais e $\zeta = \frac{z-w}{n}$ é uma constante, onde o termo $z - w$ representa a carga nuclear efetiva, com w sendo uma constante de blindagem.

Os STOs são utilizados principalmente em sistemas atômicos e diatônicos que requerem alta precisão, especialmente em métodos semi-empíricos que negligenciam todas as integrais de três e quatro centros. Essas funções correspondem as funções não ortogonais e não permitem uma solução analítica e rápida para as integrais de dois elétrons de mais de um centro ou ainda integrais de atração eletrostática entre elétrons e núcleos de três centro. Além disso, suas formas radiais são mais adequadas em comparação com as funções de tipo GTO, que sequem um comportamento exponencial $X = r$ ao contrário das gaussianas, que seguem um comportamento $X = r^2$ (192).

Por outro lado, as funções de base do tipo gaussianas (GTOs) foram introduzidas por Boys em 1950 como uma alternativa às STOs, sendo aplicadas em cálculos moleculares que envolvem mais de um núcleo. As funções GTOs exibem um comportamento exponencial ($X = r^2$) e não apresentam um comportamento nodal radial. Elas permitem solução analítica para integrais de energia, sendo mais fáceis de resolver do que as funções do tipo STOs (192).

$$X_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \varphi) = NY_{l,m}(\theta, \varphi)r^{2(n-1)-l}e^{\zeta r^2} \quad (6)$$

Para descrever adequadamente uma ligação química em cálculos computacionais, é necessário incluir *funções de polarização* nos conjuntos de base. Essas funções são importantes porque permitem que os orbitais atômicos se deformem, ou seja, se polarizem em resposta à presença de átomos vizinhos. Esse efeito ocorre principalmente em ligações dentro da própria molécula, onde a densidade eletrônica é distorcida conforme os átomos se aproximam e interagem. Por exemplo, durante a formação de uma ligação covalente, o orbital *s* do átomo de hidrogênio pode se polarizar em direção a um átomo mais eletronegativo, como o oxigênio, permitindo uma descrição mais realista da ligação. Por exemplo, durante a formação da ligação química, o orbital *s* do átomo de hidrogênio pode receber contribuição do orbital *p*. Da mesma forma, os orbitais *p* de átomos maiores, como o

Li, podem começar a incorporar contribuições dos orbitais *d*, e assim por diante. Portanto, a adição de funções de polarização é essencial para descrever os orbitais moleculares. As funções de polarização são comumente representadas pela notação (*) ou (d, p), onde se adicionam orbitais do tipo *p* para o hidrogênio e orbitais *d* para os átomos pesados (193).

Além disso, para fornecer uma melhor descrição de sistemas moleculares, como ânions, complexos fracamente ligados e estados excitados (que contêm elétrons fracamente ligados e apresentem uma expansão da nuvem eletrônica), é necessário empregar funções difusas. Essas funções permitem descrever uma região maior do espaço ocupados pelos orbitais. As funções difusas são indicadas pelo símbolo (+), indicando que foram adicionadas aos orbitais (s) e (p) de átomos pesados, enquanto o símbolo (++) denota a inclusão de funções difusas do tipo (s) dos átomos de hidrogênio (193).

Entre as funções de base comumente usadas são 6-311G** (194), cc-pVDZ, (195). Exemplos de funções do tipo gaussianas incluem 6-31G(d), 6-31G(2df), 6-31+G(d), 6-311++G(d,p) (196–199). Por exemplo, a base 6-311++G (d,p) significa que os elétrons do núcleo são descritos por uma função contraída composta por 6 primitivas gaussianas (representada pelo "6"). Os elétrons de valência são descritos por três funções contraídas: a primeira composta por 3 primitivas, e as outras duas por 1 primitiva cada ("311"). Os dois sinais “++” indicam a adição de funções difusas tanto para átomos pesados quanto para hidrogênio. As letras (d,p) mostram que funções de polarização *d* são adicionadas aos átomos pesados e *p* ao hidrogênio, melhorando a representação da polarização da nuvem eletrônica.

Nos estudos realizados por Riaz et.al (2024) sobre a modelagem computacional de compostos polifenólicos com relevância medicinal e interesse no desenvolvimento de fármacos, o uso do método DFT/ B3LYP com os conjuntos de base 3-21G, 6-31G e 6-311G em cálculos no estado fundamental resultou em geometrias moleculares teóricas que se alinham com os valores determinados por métodos experimentais (200). Em outro estudo, foram isolados 12 compostos a partir de extratos das folhas, raízes e cascas da *Artemisia abyssinica*. Por meio de estudos *in vitro* e *in silico*, com DFT (B3LYP/ 6-31G (d,p)) e docking molecular, validou-se o uso tradicional da planta no tratamento de infecções microbianas e câncer (201).

Portanto, a aplicação da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), aliada à escolha adequada das funções de base, constitui uma ferramenta robusta para a investigação de interações moleculares, permitindo a previsão de atividades farmacológicas, a elucidação de mecanismos de ação, e a análise de propriedades eletrônicas, estabilidade e reatividade de ligantes. Além disso, oferece suporte teórico para a interpretação e complementação de dados experimentais.

2.5.2.2 Funcionais de troca e correlação eletrônica

A expressão exata do funcional da energia de troca e correlação $E_{xc}[\rho]$, representa uma das principais fontes de erro no método DFT, especialmente devido à natureza aproximada da energia de troca e de correlação. Assim, a implementação das equações de Kohn-Sham na DFT depende criticamente da qualidade do funcional de troca-correlação para seu sucesso. Diversos funcionais foram desenvolvidos para obter formas aproximadas para esta energia, como LDA, GGA, mPW91, B3LYP, MPW1K, PBE1PBE, BLYP, BP91 e PBE, os quais diferem quanto às estratégias teóricas e ao grau de complexidade na representação das interações eletrônicas.

Segundo Ziegler (202), os funcionais de troca-correlação podem ser classificados em três gerações. A primeira geração é composta pelos funcionais baseado na aproximação da densidade local (LDA) (203,204) que se mostram adequados para descrever sistemas com densidade eletrônica quase uniforme. No entanto, em casos onde a densidade eletrônica é fortemente não uniforme, é necessário utilizar a Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA) (205,206). A aproximação LDA considera que a energia de troca e correlação do sistema eletrônico pode ser expressa como a integração das contribuições locais de um gás de elétrons homogêneo, representadas por ε_{xc}^h , assumindo variações suaves da densidade eletrônica nas vizinhanças do ponto r . Essa suposição confere à LDA um caráter estritamente local, dependente apenas da densidade no ponto analisado (207).

$$E_{xc}(\rho) = \int \rho(r) \varepsilon_{xc}^h(\rho(r)) d^3r \quad (7)$$

Assim, tem-se a seguinte equação para o potencial de troca e correlação eletrônica:

$$v_{xc}(\rho) = \frac{d\rho(r)\varepsilon_{xc}^h(\rho(r))}{d\rho(r)} \quad (8)$$

Desta forma, na aproximação LDA o termo $\text{Exc}(\rho)$ passa a ser escrito como:

$$E_{xc}(\rho) \cong E_{xc}^{LDA}(\rho)[\varepsilon_X(\rho(r)) + \varepsilon_c(\rho)(r)]d^3r \quad (9)$$

A equação o termo de troca, E_x é separado do termo de correlação, ε_c . O termo ε_c pode ser facilmente obtido por um operador de troca de HF, porém o termo ε_c não pode ser estabelecido exatamente, mesmo em sistemas onde a densidade eletrônica é aproximadamente uniforme. Assim essa aproximação falha no cálculo da energia de troca e correlação eletrônica em sistemas não uniformes, consequentemente, essa aproximação falha na reprodução das propriedades de materiais. Como forma de tratar a não homogeneidade dos vários sistemas eletrônicos foi proposto a aproximação do Gradiente Generalizado (GGA).

A segunda geração de funcionais utiliza a densidade eletrônica e seu gradiente, sendo conhecida como Aproximação do Gradiente Generalizada (GGA-Generalized Gradient Approximation) (205). O termo de troca e correlação na aproximação GGA é escrito como (205):

$$E_{xc}^{GGA} = \int f[\rho(r), \nabla\rho(r)]d^3r \quad (10)$$

Na aproximação do GGA, o $E_{xc}(\rho)$ pode ser expresso em função do gradiente da densidade eletrônica total, diferente do caso na aproximação LDA, que leva em conta apenas a densidade no ponto r . Além disso, inclui o gradiente da densidade eletrônica ($\rho\nabla$) para calcular a energia de troca e correlação. Os funcionais mais amplamente utilizados nessa aproximação foram desenvolvidos por Becke para a troca (208), e por Perdew e Lee para a correlação (201,209). Perdew e Wang também contribuíram com funcionais de troca e correlação (210).

A terceira geração de funcionais inclui os híbridos, que combinam as características dos funcionais GGA de troca e correlação com a equação de Hartree-Fock, que é um formalismo não-local. Esses funcionais foram desenvolvidos por meio da interligação entre energias local e não-local, com a inclusão de parâmetros semi-

empíricos. O funcional híbrido de troca-correlação comumente utilizado é o B3LYP, inicialmente proposto por Becke (201,211), sendo amplamente utilizado no estudo de moléculas orgânicas. Esse funcional incorpora um termo de troca desenvolvido por Becke, designado pela letra B, e um termo de correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr, representado pela sigla LYP. Além disso, inclui três parâmetros empíricos otimizados para melhorar seu desempenho, indicados pelo número 3.

Diversos outros funcionais têm sido sugeridos como M05-2X, M05, PW6B95, PWB6K, MPWB1K que se mostram eficientes para aplicações gerais em termoquímica, cinética e interações não covalentes envolvendo não metais (205). O funcional M06-L destaca-se por oferecer um melhor desempenho geral de qualquer funcional para uma combinação de termoquímica, cinética termoquímica, interações metaloquímicas e não covalentes, comprimentos de ligação e frequências vibracionais (212). O funcional M06-2X é particularmente eficaz em aplicações envolvendo termoquímica do grupo principal, cinética, interações não covalentes e energias de excitação eletrônica, enquanto M06 é frequentemente aplicado em contextos organometálicos (213).

No que diz respeito às energias de ligação em complexos de interações não ligadas, como ligações de hidrogênio, transferência de carga, interações dipolo e interações fracas, os funcionais PBE, PBE1PBE, B3P86, MPW1K, B971 e BHandHLYP demonstraram desempenho superior na descrição das ligações de hidrogênio, enquanto MPW3LYP, B97-1, PBE1KCIS, B98 e PBE1PBE oferecem os melhores resultados para interações dipolo-dipolo. Por fim, B97-1, MPWB1K, PBE1KCIS e MPW1B95 se destacam nas interações fracas (214).

Não há uma resposta definitiva para a pergunta "Qual é o melhor funcional DFT?", pois funcionais que apresentam bons resultados em compostos orgânicos podem não ser igualmente eficazes em compostos inorgânicos. Da mesma forma, aqueles que fornecem resultados satisfatórios para variações de energia em reações podem não se aplicar a outros contextos. Portanto, a escolha do funcional ideal depende do tipo de compostos em estudo e das propriedades específicas que se deseja investigar.

Capítulo 3

METODOLOGIA *IN VIVO E IN SILICO*

3.1 Procedimentos éticos

O trabalho seguiu as diretrizes recomendadas pela lei 11.794 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Piauí e aprovado sob o protocolo número 006201/2022-10. A atividade de acesso ao Conhecimento Tradicional Associado, nos termos exigidos pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen, em conformidade com as disposições da Lei nº 13.123/2015 e suas regulamentações, foi registrada sob o número A8B513F.

3.2 Protocolo experimental

Altas doses de pilocarpina induzem status epilepticus ou status mal epilepticus (SMA), uma convulsão prolongada que causa danos cerebrais semelhantes a uma condição epileptogênica em humanos. Camundongos machos da espécie *Mus musculus* (25–30 g, n = 6/grupo) do Biotério da Universidade Estadual do Piauí foram utilizados devido à disponibilidade no viveiro. Os animais foram divididos em 5 grupos: Grupo controle negativo: recebeu solução salina 0,9% por via oral (v.o.) na dose de 0,1 mL/10 g; Grupo controle positivo: recebeu diazepam 4 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.); Grupos de teste: receberam óleo essencial das folhas de *C. heliotropifolius* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.).

O óleo essencial das folhas de *C. heliotropifolius* foi adquirido no Laboratório de Química, Campus Prof. Alexandre Alves de Oliveira, UESPI, Parnaíba-PI, Brasil.

Todos os animais foram tratados com solução salina ou óleo por 1 hora ou diazepam por 30 minutos antes da indução das convulsões. Após 1 hora ou 30

minutos dos tratamentos mencionados, metilescopolamina 1 mg/kg foi administrada (a todos os animais). Após 30 minutos, pilocarpina 400 mg/kg (i.p.) foi administrada a todos os grupos. O propósito da administração de metilescopolamina era atenuar os efeitos periféricos causados pela injeção de pilocarpina, como hiper-secreção. Para comparar a severidade das convulsões entre os grupos após a administração deste agente químico, os seguintes parâmetros foram observados: latência para o início das convulsões e latência até a morte. Cada animal foi observado por 1 hora. A latência para o início das convulsões e o tempo até a morte do animal foram registrados em minutos.

3.3 Análise estatística dos dados

Os resultados foram avaliados utilizando o método ANOVA, seguido do teste post hoc de Tukey, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. O nível de significância foi de 95%.

3.4 Estudo DFT

As estruturas tridimensionais dos 33 ligantes e fármacos de referência (diazepam, clonazepam e cetamina) foram obtidas na plataforma PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e suas geometrias otimizadas, por meio de cálculos DFT, em solução aquosa usando o funcional B3LYP (201) e o conjunto de base 6-311++G(d,p) (211), usando do software Orca 5.0.3 (215). O efeito solvente foi simulado por meio modelo implícito SMD (216). As propriedades eletrônicas dos ligantes foram calculadas no mesmo nível teórico da otimização de geometria e visualizadas no programa Avogadro (versão 1.2.0.) (217). Os Mapas de potencial eletrostático molecular (MEP) foram gerados no Avogadro com valor de isosuperfície de 0,002 a.u e visualizados no programa Jmol (versão 14) (218) para a identificar as regiões de reatividade nucleófila e eletrófila das moléculas. Os orbitais moleculares de fronteira HOMO e LUMO foram calculados e suas energias usadas para o obter alguns descritores de reatividade química global, tais como, potencial de ionização (I), afinidade eletrônica (A) (219), potencial químico eletrônico (μ), dureza (η) (220),

eletronegatividade (χ) (221), eletrofilicidade (ω) (222) e Gap de energia HOMO-LUMO (223). Essas quantidades foram calculadas conforme as equações abaixo:

$$I \simeq -\varepsilon HOMO \quad (11)$$

$$A \simeq -\varepsilon LUMO \quad (12)$$

$$\mu \simeq -\frac{(I+A)}{2} \quad (13)$$

$$\eta \simeq \frac{(I-A)}{2} \quad (14)$$

$$\chi \simeq \frac{(I+A)}{2} \quad (15)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (16)$$

3.5 Docking Molecular

3.5.1 Preparação dos ligantes

Após a otimização das estruturas moleculares, estas foram convertidas para o formato PDB por meio do programa Avogadro (versão 1.2.0.) e posteriormente protonadas em condições fisiológicas (pH=7,4) usando o software OpenBabel (version 3.1.0). Posteriormente, foram adicionadas as cargas atômicas de Gasteiger (224), hidrogênios polares adicionados e os não polares suprimidos nas estruturas. Finalmente os arquivos foram convertidos para o formato PDBQT usando o AutoDock Tools (versão 1.5.7).

3.5.2 Preparação das proteínas

A estrutura do receptor GABA_A humano do subtipo α1β2γ2 (PDB ID: 6X3X), obtida por microscopia eletrônica com resolução de 2,92 Å e complexada a um modulador alostérico positivo (benzodiazepílico) (225) foi selecionada por sua adequação a estudos de acoplamento molecular em sítios benzodiazepínicos. Adicionalmente, foi utilizada a estrutura do canal de íons do receptor NMDA com subunidades GluN1a/GluN2B (PDB ID: 4PE5) (50), que apresenta resolução de 3,96 Å e inclui o domínio de ligação para o cetamina, sendo relevante por sua participação na modulação excitatória do sistema nervoso central e sua implicação na fisiopatologia da epilepsia. Ambas as estruturas foram obtidas no banco de dados RCSB (<http://www.rcsb.org>). O software UCSF ChimeraX (226), foi usado para remover os ligantes e moléculas de água, além de isolar os sítios de ligação.

Os locais de ligação do GABA_A selecionados para o estudo incluem o local clássico de benzodiazepínicos, localizado na interface extracelular α1⁺(D)/γ2⁻(E) (sítio 1), e três sítios adicionais de ligação do diazepam no domínio intracelular, localizados nas interfaces: β2^{+(C)}/α1^{-(D)} (sítio 2), β2^{+(A)}/α1^{-(B)} (sítio 3) e β2^{-(A)}/γ2^{+(E)} (sítio 4)(225). Além disso, o sítio de ligação da molécula 4-[(1R,2S)-2-(4-benzilpiperidina-1-il)-1-hidroxipropila]fenol (ifenprodil), localizado na interface das cadeias GluN1/GluN2B do receptor NMDA, também foi investigado.

Para prever com precisão a conformação de um ligante em um sítio de ligação proteica, é essencial considerar o estado de protonação da proteína, que deve estar em consonância com o pH das condições experimentais (227). Uma vez selecionados os sítios, as cadeias de ambos os receptores foram protonadas em condições fisiológicas (pH=7,4) usando a plataforma PDB2PQR (<https://pdb2pqr.readthedocs.io/en/latest/>). Posteriormente, as cargas atômicas de Gasteiger (224), e hidrogênios polares necessários aos cálculos foram adicionados, sendo os hidrogênios não polares suprimidos, e então as estruturas foram convertidas para PDBQT usando as ferramentas do AutoDock tools.

3.6 Redocking e docking molecular

O acoplamento molecular foi realizado usando o software Autodock Vina (163), seguindo a metodologia de Barros e colaboradores (228). O tamanho da caixa de grade foi definido como 22,5 Å para cada eixo. A caixa de grade foi centrada nas coordenadas dos átomos de oxigênio dos resíduos SER D:205, ILE D:228, ILE B:228 e GLN A:224, identificados nos sítios de ligação 1, 2, 3 e 4 do receptor GABA_A, respectivamente, por meio do programa LigPlot (229). Para o receptor NMDA, aplicou-se o mesmo procedimento, sendo selecionado o resíduo GLN110 correspondente ao sítio 5 como centro da caixa de docking, Tabela 3.1. O número de modos (poses) foi definido como 50 e exaustividade em 24 para garantir uma análise abrangente. As simulações de acoplamento foram conduzidas usando a estrutura rígida das proteínas e as estruturas flexíveis dos ligantes. O redocking foi realizado para os ligantes diazepam (DZP) e ifenprodil obtidos por microscopia eletrônica. As poses dos complexos proteína-ligante e as interações intermoleculares foram visualizados usando o Discovery Studio (230).

Tabela 3.1. Resíduos proteicos envolvidos no sítio de interação com o ligante e coordenadas dos átomos de oxigênio usados para definir o sítio (X, Y, Z).

Sítio	Cadeia	Resíduo	Átomo de referência	Coordenadas (x, y e z)
1	α1+(D)/γ2-(E)	SER205	Oxigênio	X=84,334, Y=128,228, Z=100,421
2	β2+(C)/α1-(D)	ILE228	Oxigênio	X=120,919, Y=138,912, Z=133,941
3	β2+(A)/α1-(B)	ILE228	Oxigênio	X=143,346, Y=118,609, Z=123,685
4	β2-(A)/γ2+(E)	GLN224	Oxigênio	X=137,534, Y=129,041, Z=110,812
5	GluN1/GluN2B	GLN110	Oxigênio	X=0,744, Y=29,422, Z=11.157

Os valores dos desvios quadráticos médios (RMSD) da sobreposição entre as moléculas nativas e as resultantes do docking foram calculados com o programa Discovery Studio para validar o método. Depois de validado o protocolo, os 33 ligantes e fármacos padrões foram docados nos respectivos sítios de ligação das proteínas alvos.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade anticonvulsivante *in vivo*

Após o tratamento com veículo (0,1 mL/10g de animal, v.o.), diazepam (4 mg/kg, i.p.) e óleo de folha de *C. heliotropifolius* (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), houve um aumento na latência da primeira convulsão no grupo que recebeu OCH na dose de 200 mg/kg ($33,00 \pm 18,47$, * $p < 0,05$). Houve um aumento na latência da primeira convulsão no grupo de animais tratados com OCH na dose de 200 mg/kg ($33,00 \pm 18,47$, * $p < 0,05$) e diazepam ($44,85 \pm 21,27$, *** $p < 0,001$) em comparação ao controle negativo ($7,43 \pm 1,74$) (Figura 1).

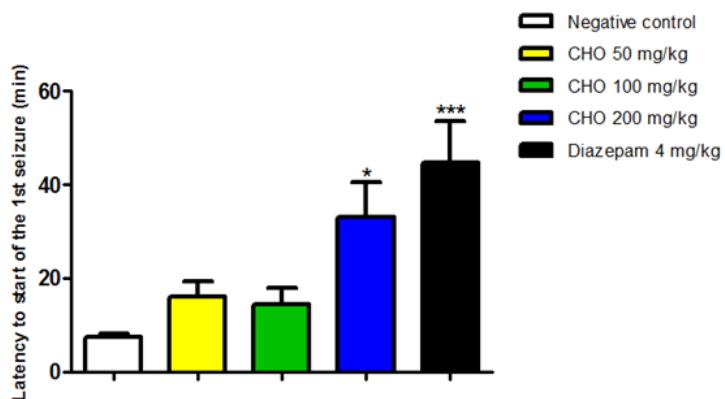


Figura 4.1. Efeito do óleo essencial de *Croton heliotropifolius* Kunth (OCH), (n=6/grupo). Folhas, em doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o) sobre a latência para a primeira crise induzida por Pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como média ± desvio padrão.

Os sesquiterpenos inibem a enzima GABA transaminase, levando ao aumento dos níveis de GABA no sistema nervoso central e resultando em efeitos sedativos e tranquilizantes. Como mostrado na Figura 4.1, os grupos tratados com OCH (200 mg/kg) e diazepam exibiram um tempo de latência prolongado antes do início da

primeira convulsão, sugerindo um mecanismo de ação semelhante ao do diazepam. Além disso, a latência até a morte foi significativamente estendida em animais pré-tratados com OCH (200 mg/kg) ($38,69 \pm 19,97$, ** $p < 0,01$) e diazepam (60,00 ± 0,00, *** $p < 0,001$) em comparação com o grupo controle negativo ($8,81 \pm 2,18$), o desvio padrão é zero, pois não houve mortes durante o período de observação (1h). (Figura 4.2).

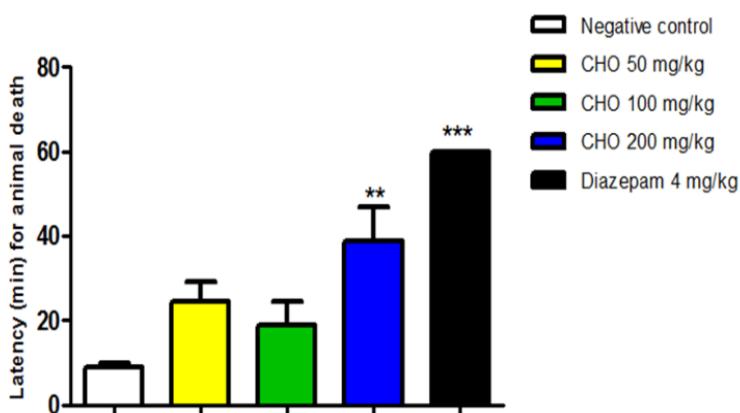


Figura 4.2. Efeito do óleo essencial de *Croton heliotropifolius* Kunth. Folhas (OCH), em doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o) sobre a latência para a morte dos animais, após a indução de convulsões por Pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como média ± desvio padrão ((n=6/grupo)). Diferença estatisticamente significativa se $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey), ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle negativo.

Um estudo realizado com o óleo essencial de *Croton zehntneri* mostrou um aumento no limiar para o início de convulsões mínimas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), sugerindo o potencial anticonvulsivante de plantas pertencentes ao gênero *Croton*. O presente estudo corrobora os resultados obtidos com o OCH.

4.2 Validação da metodologia de docking molecular por redocking

Para garantir um acoplamento eficaz, é fundamental validar o protocolo de docking, reencaixando o ligante obtida por microscopia eletrônica de volta ao sítio de ligação conhecido. A validação requer que o valor de RMSD seja $\leq 2 \text{ \AA}$ (231,232).

Quanto menor esse valor, mais exata será a posição do ligante em relação a estrutura nativa, aumentando os acertos na previsão das afinidades e interações entre ligantes e proteínas. As estruturas do DZP foram redocadas nos bolsos de ligação distintos dos BDZs nos sítios 1, 2, 3 e 4 do GABA_A e o ifenprodil no sítio 5 do receptor NMDA. Os valores de RMSD das poses de redocking estão detalhados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. RMSD (Å) dos ligantes co-resolvido por microscopia eletrônica, após procedimento de redocking nos sítios 1, 2,3 e 4 do GABA_A e sítio 5 do NMDA.

Receptor	RMSD (Å)				
	GABA _A				NMDA
	1	2	3	4	5
	0,41	0,46	0,74	0,31	0,62

Com base na análise dos resultados obtidos para validação, todos os valores de RMSD foram inferiores a 2 Å, validando assim a metodologia aplicada no trabalho. As sobreposições das estruturas dos ligantes antes e depois do redocking podem ser visualizados na Figura 4.3.

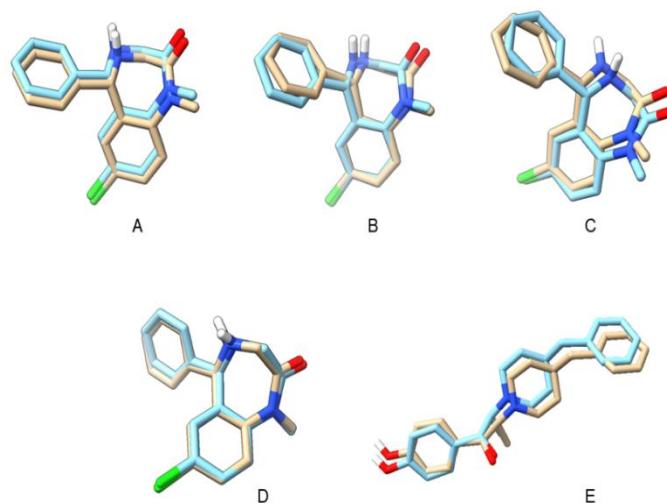


Figura 4.3. Sobreposição do ligante obtida por microscopia eletrônica DZP (bege) com os ligantes de redocking (azul) nos sítios de ligação 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) do GABA_A, e do ligante ifenprodil (bege) com o ligante de redocking (azul) no sítio 5 do receptor NMDA (E).

4.3 Docking molecular

Para entender os possíveis receptores e locais de ação dos compostos no óleo, realizamos um estudo de docking molecular focando nos receptores GABA_A e NMDA. A precisão das poses de docking foi estimada por cálculos de redocking. Os valores de RMSD obtidos para todos os locais foram inferiores a 2 Å: sítio 1 (0,41 Å), 2 (0,46 Å), 3 (0,74 Å), 4 (0,31 Å) e 5 (0,62 Å), validando assim o método.

Os valores de energia de ligação obtidos nas simulações de docking foram utilizados como critério para selecionar os ligantes com maior potencial de interação com os receptores GABA_A e NMDA. Esses escores, calculados pelo AutoDock Vina, representam uma estimativa empírica da energia livre de ligação, considerando interações do tipo van der Waals, ligações de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e penalidades associadas à deformação conformacional do ligante.

No entanto, por se tratarem de modelos simplificados, esses valores não refletem com precisão a afinidade de ligação real, sendo limitados pela rigidez da proteína, ausência de solvente explícito e simplificações entropicamente relevantes. Assim, os resultados devem ser interpretados como uma etapa preliminar de triagem *in silico*, útil para priorizar os compostos mais promissores.

4.3.1 Docking molecular com o receptor GABA_A

O acoplamento molecular é um método computacional que visa prever a melhor orientação e conformação de um ligante no sítio ativo de ligação no receptor, normalmente proteínas (233), prever as afinidades das interações entre os ligantes e os receptores (234), além de poder realizar a triagem virtual de uma grande quantidade de compostos, tendo como objetivo classificar resultados, propor hipóteses estruturais e identificar estruturas com maior probabilidade de se ligar a um determinado alvo farmacológico (235).

Os receptores do GABA_A estão entre os principais alvos para a redução dos sintomas da convulsão e estão presentes em grande quantidade das sinapses cerebrais dos mamíferos (51), assim como receptores serotonérgicos, dopaminérgicos, glutamatérgicos, tornando-se alvo potencial para novos medicamentos anticonvulsivantes.

Para investigar a afinidade de ligação dos compostos pelo GABA_A, realizamos estudos de docking molecular. No docking molecular a força de interação entre os ligantes e o receptor é uma medida da energia de ligação, quanto menor a energia de ligação mais forte é a interação (236). Para o estudo da afinidade dos compostos pelos sítios-alvo, considerou-se que energias de ligação $\leq -7,0$ kcal/mol indicam afinidade pelos receptores (228). A maioria dos compostos apresentaram energias de ligação de moderada a boa pelos sítios alvos, com energias de ligação variando de -7,0 a -10,0 kcal/mol. As energias de ligação de todos os fitoconstituintes do OCH com o receptor estão descritas na Tabela 4.2.

Entre todos os compostos analisados, destacam-se alguns ligantes pertencentes à classe dos sesquiterpenos, os quais apresentaram boa afinidade pelos sítios de ligação dos BDZs, conforme mostrado na Tabela 4.2. Notavelmente o sítio de ligação padrão (sítio 1) demonstrou ser o mais promissor, exibindo energia de ligação de -9,1 a -10,0 kcal/mol, comparável aos valores obtidos para o diazepam (-10,3 kcal/mol) e clonazepam (-10,4 kcal/mol) que são os fármacos usados no tratamento das crises convulsivas.

Tabela 4.2. Energias de ligação obtidas para os compostos identificados no OCH e fármacos de referência nos sítios de ligação alvo dos receptores GABA_A.

Compostos	Afinidade de ligação (kcal/mol)			
	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3	Sítio 4
Monoterpenos hidrocarbonetos				
α-tujeno	-7,4	-6,7	-6,4	-6,0
α -pineno	-6,4	-6,0	-6,0	-6,2
Sabineno	-6,9	-6,3	-6,2	-5,9
β- pineno	-6,3	-5,9	-5,9	-6,2
Mirceno	-7,0	-6,2	-5,8	-5,7
α-felandreno	-7,4	-6,8	-6,7	-6,1
(+) - careno-3	-7,5	-6,6	-6,4	-6,4
α-terpineno	-7,4	-6,4	-6,5	-6,1
ρ-cimeno	-7,4	-6,8	-6,8	-6,3
Limoneno	-7,6	-6,7	-6,6	-6,1
β-felandreno	-7,6	-6,7	-6,5	-6,3
γ-terpineno	-7,4	-6,7	-6,8	-6,3
α-terpinoleno	-8,0	-7,1	-7,1	-6,1
Monoterpenos oxigenados				
1,8-cineol	-6,2	-6,3	-6,2	-6,3
Linalol	-6,4	-6,0	-5,7	-6,3
isoborneol	-5,7	-7,4	-6,2	-6,0
Terpinene-4-ol	-7,7	-6,8	-6,8	-6,3
α-terpineol	-7,1	-6,6	-6,4	-6,5
Sesquiterpenos hidrocarbonetos				
β-bourboneno	-9,2	-7,6	-8,0	-7,4
β- elemeno	-8,9	-7,8	-8,2	-6,8
β-isocomeno	-5,7	-7,4	-7,4	-6,8
Trans-cariofileno	-8,6	-7,2	-7,0	-6,9
Guaiadieno	-9,1	-8,7	-8,7	-7,6
α – humuleno	-7,8	-6,6	-7,0	-5,7
Epi-trans-cariofileno	-8,1	-7,9	-7,9	-6,9
Germacreno-D	-9,1	-8,2	-8,3	-6,5
Biciclogemacreno	-6,8	-8,5	-8,3	-7,1
α-bulneseno	-10,0	-8,2	-8,7	-7,5
δ-cadineno	-9,7	-9,0	-8,8	-8,1
Sesquiterpenos oxigenados				
Germacreno-B	-7,7	-7,2	-7,2	-5,9
Espatulenol	-8,8	-8,3	-8,1	-6,5
Óxido cariofileno	-7,3	-7,7	-7,9	-6,0
Iso-espatulenol	-9,2	-6,9	-7,0	-7,7
Fármacos de referência				
Diazepam	-10,3	-9,7	-9,5	-8,7
Clonazepam	-10,4	-9,0	-9,7	-8,6

Como mostrado na Tabela 4.2, o α -bulneseno apresentou a maior afinidade pelo receptor GABA_A, com energia de ligação de -10,0 kcal/mol, especialmente no sítio 1 de ligação dos BDZs. Em seguida, destacaram-se o δ -cadineno e o β -bourboneno. Esses resultados indicam um potencial interativo favorável desses compostos com o receptor.

No presente estudo os sesquiterpenos germacreno D, germacreno B, β -elemeno e epi-trans-cariofileno mostraram afinidade moderada e boa pelo sítio 1 do receptor GABA_A, com energias de ligação variando de -7,7 a -9,1 kcal/mol. No entanto, apresentaram menor afinidade pelos demais sítios, com valores de energia de ligação variando de -5,9 a -8,3 kcal/mol. Esse comportamento é semelhante ao observado para os BDZs, que se ligam preferencialmente ao sítio 1, apresentando maior afinidade por esse local específico do receptor GABA_A em comparação com outros sítios (237).

Os monoterpenos limoneno, mirceno e α -terpineol demonstraram potencial efeito anticonvulsivante em modelos animais de convulsões induzidas por PTZ, sugerindo uma possível atuação como moduladores dos receptores GABA_A (136,141,238). No presente estudo, realizado *in silico*, esses compostos apresentaram energias de ligação moderadas, variando de -7,0 a -7,6 kcal/mol nos sítios dos BDZs. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que atuem sobre outros sítios da proteína, contribuindo para seu efeito anticonvulsivante.

Os monoterpenos α -pelandreno, terpinoleno e terpin-4-ol no presente estudo apresentaram energia de ligação moderada, variando de -7,4 a -8,0 kcal/mol. Estudos *in vitro* realizados por Kessler et al, utilizando as isoformas $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ e $\alpha 1\beta 2$ do receptor GABA_A (51), bem como testes em modelos animais (139), demonstraram a ausência de efeito modulador das moléculas administradas isoladamente. Com base nessas evidências, sugere-se que o sítio de ligação dos BDZs não desempenha um papel relevante na interação individual desses compostos. No entanto, as energias de ligação calculadas sugerem afinidade potencial com o receptor, indicando que essas substâncias, em combinação, podem atuar de forma sinérgica na modulação do receptor GABA_A.

Infelizmente, o efeito sinérgico entre os compostos não pôde ser avaliado por meio do docking molecular realizado neste estudo, devido à limitação da técnica em simular interações simultâneas de múltiplos ligantes com o receptor. Investigações

adicionais, utilizando abordagens complementares, como dinâmica molecular ou estudos *in vitro*, poderão ser necessárias para validar essa hipótese.

No caso dos monoterpenos α -pineno, β -pineno e sabineno, o presente estudo observou baixa afinidade pelos sítios BDZs do GABA_A, com energias de ligação variando de -5,9 a -6,9 kcal/mol. Esses resultados estão em concordância com estudos experimentais que relatam ausência de atividade moduladora dessas moléculas sobre as isoformas $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ e $\alpha 1\beta 2$ do GABA_A (51).

Por outro lado, embora o linalol tenha demonstrado alta atividade modulatória *in vitro* (51), o presente estudo sugere que essa atuação ocorre por meio de sítios distintos dos sítios de BDZs, uma vez que a afinidade pelo sítio dos BDZs foi relativamente baixa (-5,7 a -6,4 Kcal/mol). Isso reforça a hipótese de que o linalol atua por um mecanismo alternativo de modulação, que pode incluir sítios alostéricos não abordados neste trabalho.

Além da afinidade de ligação é importante identificar a natureza das interações intermoleculares presentes nos sítios de ligação da proteína responsáveis pela afinidade e possível efeito modulador. Na Figura 4.4, são mostradas as interações dos ligantes mais promissores com os resíduos de aminoácidos do sítio 1, enquanto que as interações com os demais sítios são mostradas nas Figuras A1-A3 (Apêndice A).

Interações de Van der Waals, hidrofóbicas, eletrostáticas e ligação de hidrogênio são as mais recorrentes entre ligantes e proteínas (239). As interações hidrofóbicas ocorrem entre grupos apolares e como os sítios ativos de proteínas são compostos em sua maioria por grupos hidrofóbicos, desempenham papel fundamental no processo de docking proteína-ligante (240,241).

Conforme ilustrado na Figura 4.4, os compostos estabelecem diversas interações hidrofóbicas do tipo alquil e π -alquil, as quais se revelaram essenciais para a estabilização dos ligantes no sítio 1 da proteína. Interações hidrofóbicas do tipo alkil ocorre entre cadeias apolares (grupos alquil como $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$) por forças de van der Waals. Já as Interação π -alkil ocorrem entre um anel aromático (sistema π) e um grupo alquil.

Dentre as interações hidrofóbicas, destaca-se o papel essencial do resíduo fenilalanina 77 (Phe77), localizado na subunidade $\gamma 2^-(E)$, que contribui diretamente para a formação do sítio de ligação de alta afinidade das BDZs no receptor GABA_A. Esse resíduo demonstrou ser crucial para a acomodação dos ligantes, participando

de múltiplas interações do tipo π -alquil. Para o α -bulneseno, essas interações ocorreram com distâncias entre 4,21 e 5,37 Å; para o cadineno, entre 3,81 e 5,02 Å; e para o β -bourboneno entre 3,57 e 5,11 Å. Essas distâncias estão de acordo com valores previamente relatados para interações π -alquil envolvendo compostos de origem natural em estudos anteriores (242), sugerindo contribuição significativa para a estabilidade dos complexos ligante-proteína. A recorrência dessa interação reforça o papel da Phe77 como resíduo chave no reconhecimento molecular, destacando a necessidade de pesquisas teóricas e experimentais adicionais para avaliar a relevância clínica dessas interações.

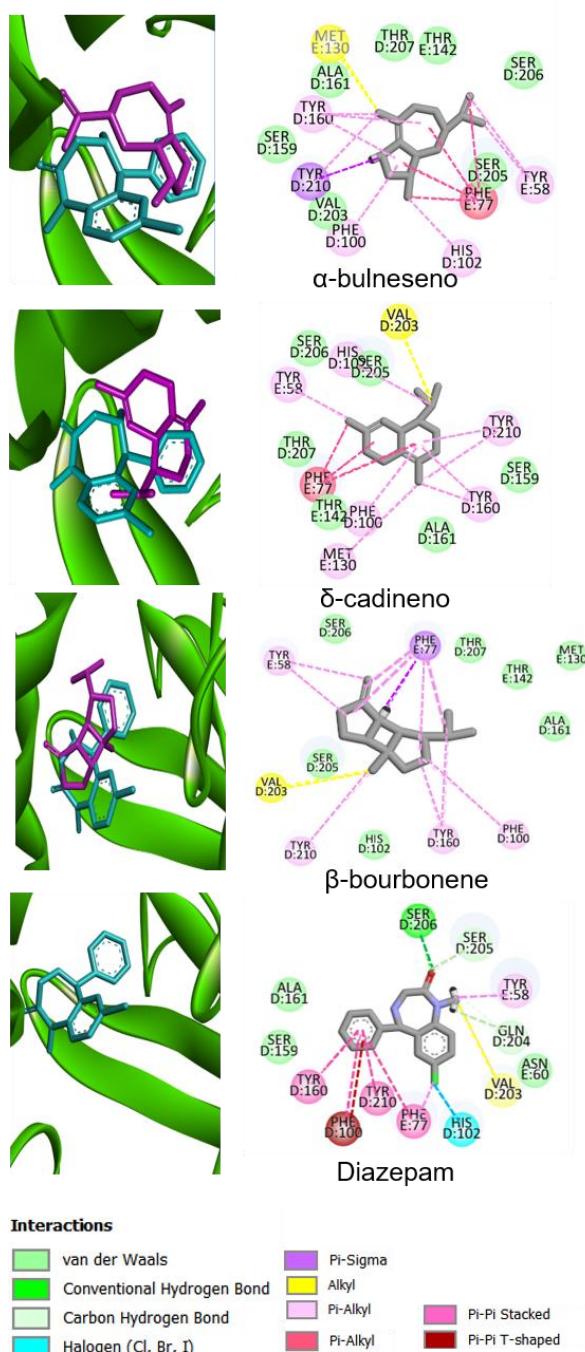


Figura 4.4. Poses do diazepam (azul) e dos ligantes com maior afinidade pelo sítio 1 do GABA_A (rosa) e diagramas 2D das interações com resíduos-chave.

A análise das poses de ligação revela que os ligantes candidatos (em rosa) apresentaram boa sobreposição com o ligante padrão (em azul), indicando que foram capazes de ocupar o mesmo sítio de ligação no receptor alvo. Essa similaridade espacial sugere a possibilidade de interação com resíduos críticos para a atividade

biológica. Embora pequenos desvios conformacionais tenham sido observados em regiões periféricas, as orientações centrais preservadas indicam potencial afinidade comparável, reforçando a hipótese de que esses compostos possam mimetizar o comportamento do ligante de referência.

Além do resíduo Phe77, os ligantes compartilham interação com diversos resíduos presentes no bolso de ligação do diazepam, como Tyr58, Tyr210, Tyr160, Phe100, e Val203 que realiza interações quando no bolso de ligação do δ-cadineno e β-bourboneno. Além disso, os ligantes α-bulneseno e δ-cadineno realizam interações com a His102, considerada como um resíduo crítico para os BDZs, influenciando diretamente na sua ação anticonvulsivantes (243). A Tabela 4.3 apresenta as interações estabelecidas pelo fármaco de referência (diazepam) e os ligantes mais promissores no sítio de ligação 1.

Tabela 4.3. Resíduos de aminoácidos do sítio 1 envolvidos na interação ligante e receptor do GABA_A.

Proteína	Ligantes	Interações com resíduos
GABA		Try58, Tyr160, Tyr210, Phe77, Phe100, His102 e
A/sítio 1	α-bulneseno	Met130
	δ-cadineno	Try58, Tyr160, Tyr210, Phe77, Phe100, His102, Met130 e Val203
	β-bourboneno	Try58, Tyr160, Tyr210, Phe77, Phe100 e Val203
	Diazepam	Try58, Tyr160, Tyr210, Phe77, Phe100, His102, Val203, Ser205, Ser206, Asn60 e Gln204

A análise dos sítios remanescentes indica que os ligantes α-bulneseno, δ-cadineno e β-bourboneno são estabilizados principalmente por interações hidrofóbicas do tipo alquil e π-alquil. No entanto, essas interações ocorrem em menor número quando comparadas às observadas com o sítio 1, o que pode justificar as menores energias de ligação obtidas (Figuras A1-A3, Apêndice A).

Nesse contexto, os sesquiterpenos bicíclicos destacaram-se por apresentarem boa afinidade pelo receptor GABA_A, em contraste com os monoterpenos monocíclicos. Essa afinidade parece estar relacionada à sua estrutura rígida e volumosa, que favorece interações com o resíduo Phe77 do receptor GABA_A, como observado nas

simulações deste estudo. Esses achados estão de acordo com estudos experimentais prévios, como os de Kessler et al. (51), que apontam que o caráter bicíclico dos terpenos contribui para a modulação do receptor GABA_A composto pelas isoformas α1β2γ2 e α1β2 (51). Assim, nossos resultados sugerem que os sesquiterpenos podem ser os principais componentes anticonvulsivantes do óleo do *C. heliotropifolius* ao atuarem como moduladores do receptor GABA_A. Contudo, devido à possibilidade de ocorrência de falsos positivos nas abordagens *in silico*, recomenda-se a realização de estudos complementares, como simulações de dinâmica molecular e ensaios *in vitro* com os compostos isolados, para validação dos achados de docking molecular.

4.3.2 Docking molecular com o receptor NMDA

Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são alvos de pesquisas clínicas produzindo evidências de que bloquear ou suprimir esses receptores inibe crises convulsivas e previne a neurodegeneração (244). Apesar dos medicamentos que atuam no receptor GABA_A, serem eficazes para tratar o *status epilepticus* breve, eles são menos eficazes para o *status epilepticus* prolongado (90). Nesse contexto, realizamos estudo de docking com o receptor NMDA usando como fármaco de referência a cetamina que se mostrou eficaz no tratamento do status epilético prolongado atuando por meio desse receptor (90).

Os estudos de docking indicaram que os sesquiterpenos δ-cadineno, guaiadieno e α-bulneseno apresentam maior afinidade pelo sítio de ligação alvo do receptor NMDA em comparação com a cetamina (-7,4 kcal/mol), conforme mostrado na Tabela 4.4. Considerando o mecanismo de ação conhecido do receptor NMDA, essa maior afinidade sugere que esses compostos possam inibir a atividade do receptor, reduzindo a entrada de íons de cálcio no neurônio e sua excitabilidade, o que poderia contribuir para a minimização das crises epiléticas.

Tabela 4.4. Energias de ligação obtidas para os compostos do OCH e fármaco de referência no sítio de ligação alvo do receptor NMDA.

Compostos	Afinidade de ligação (kcal/mol)
	Receptor NMDA
Monoterpenos hidrocarbonetos	
α-tujeno	-7,3
α -pineno	-5,6
Sabineno	-6,9
β- pineno	-5,0
Mirceno	-6,9
α-felandreno	-7,5
(+) - careno-3	-6,4
α-terpineno	-7,6
ρ-cimeno	-7,5
Limoneno	-7,4
β-felandreno	-7,3
γ terpineno	-7,5
α-terpinoleno	-7,8
Monoterpenos oxigenados	
1,8-cineol	-5,7
Linalol	-6,7
Isoborneol	-4,9
Terpinene-4-ol	-7,0
α-terpineol	-7,4
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	
β-bourboneno	-7,9
β- elemeno	-8,0
β-isocomeno	-5,8
Transcariofileno	-6,0
Guaiadieno	-8,9
G-humuleno	-6,2
Epi-trans-cariofileno	-7,5
germacreno D	-7,4
Biciclogemacreno	-6,0
α-bulneseno	-8,7
δ-cadineno	-9,4
Sesquiterpenos oxigenados	
Germacreno-B	-7,1
Espatulenol	-7,5
Óxido cariofileno	-7,3
Iso-espatulenol	-7,7
Fármaco de referência	
Cetamina	-7,4

Os compostos da classe dos monoterpenos apresentaram energias de ligação variando entre -4,9 e -7,8 kcal/mol. Em contrapartida, os sesquiterpenos, de forma geral, exibiram valores mais expressivos, entre -5,8 e -9,4 kcal/mol, evidenciando uma tendência de maior afinidade por parte dessa classe em relação ao receptor estudado.

Estudos *in vivo* utilizando modelos animais revelaram que os monoterpenos α-pineno e 1,8-cineol tem potencial para bloquear os receptores NMDA, diminuindo a superexcitabilidade durante crises epilépticas (138,245). Em nossa pesquisa, observamos que α-pineno e 1,8-cineol apresentaram energias de ligação no sítio comum da cetamina de -5,6 kcal/mol e -5,7 kcal/mol, respectivamente, indicando baixa afinidade e sugerindo uma possível ação bloqueadora por meio de outros sítios da proteína.

Dentre os monoterpenos analisados, o α-terpinoleno e α-terpineno destacaram-se por apresentar maior energia de ligação (-7,8 e -7,5 kcal/mol), indicando boa afinidade com o sítio ativo do receptor. Embora o α-terpinoleno e o α-terpineno tenham se destacado entre os monoterpenos por apresentarem boas energias de ligação, outros compostos estruturalmente semelhantes, como o limoneno, não demonstraram a mesma afinidade, a posição das duplas ligações e orientação espacial do ligante pode ser um dos fatores que comprometer a formação de interações favoráveis com resíduos-chave do sítio.

A Figura 4.5 demonstra que a acomodação dos ligantes no sítio de ligação ocorre predominantemente por meio de interações hidrofóbicas, do tipo alquil e π-alquil, contribuindo para a acomodação do ligante. Ao analisarmos as interações estabelecidas pela cetamina no sítio de ligação, observam-se interações específicas, como ligações de hidrogênio convencionais. No entanto, essas interações não foram suficientes para garantir maior afinidade pelo receptor, possivelmente devido à menor complementaridade hidrofóbica e à maior flexibilidade estrutural da cetamina, fatores que podem comprometer a estabilidade do complexo. Essa hipótese poderá ser melhor avaliada em estudos futuros por meio de simulações de dinâmica molecular.

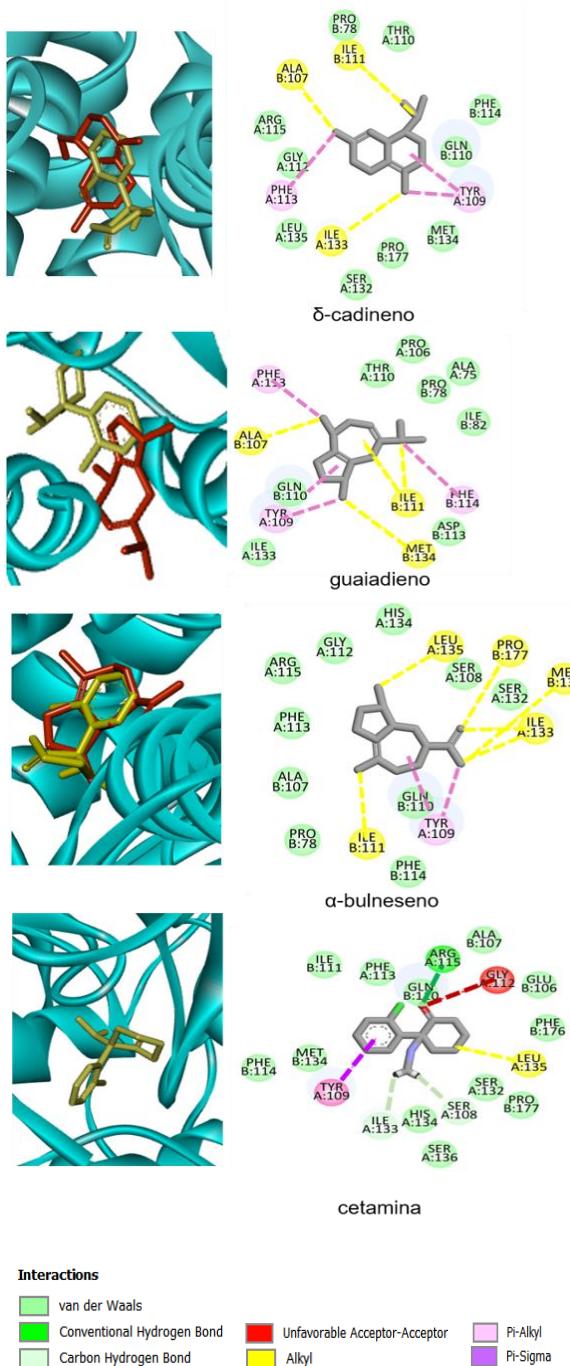


Figura 4.5. Poses da cetamina (amarelo) e dos ligantes com maior afinidade pelo sítio 5 do NMDA (vermelho) e diagramas 2D das interações com resíduos-chave.

As análises de docking revelaram que os compostos δ-cadineno e guaiadieno se acomodaram preferencialmente em regiões adjacentes ao sítio de ligação ocupado pelo fármaco de referência, evidenciando uma interação em sítios alternativos, porém funcionalmente relevantes. Apesar de não ocuparem o mesmo sítio canônico, ambos

estabeleceram interações hidrofóbicas com resíduos-chave do entorno do sítio ativo, o que pode indicar um potencial mecanismo de modulação alostérica ou indireta do alvo proteico.

O docking do δ-cadineno no NMDA revelou interações com resíduos Ile111 e Try109, que também estão presentes no sítio de ligação da cetamina, além de interações adicionais com os resíduos Ile133, Ala107 e Phe113. Por outro lado, o guaiadieno apresentou interações com resíduo Tyr109, também presente no sítio de acoplamento do fármaco de referência, além de interagir com Ile11, Ala107, Met134, Phe113 e Phe114. No caso do α-bulneseno, foram observadas interações com resíduos compartilhados com a cetamina, como Ile133, Tyr109 e Leu135, além de interações com Met134, Pro177 e Ile119, que contribuíram para o acoplamento, Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Resíduos de aminoácidos do sítio 5 envolvidos na interação ligante e receptor NMDA.

Proteína	Ligantes	Interações com resíduos
NMDA	δ-cadineno	Tyr109, Phe113, Ala107, Ile111 e Ile133
	Guaiadieno	Tyr109, Phe113, Phe114, Ala107, Ile111, Gln110 e Met134
α-bulneseno		Tyr109, Pro177, Ile111, Ile133, Leu135 e Met134
Cetamina		Try109, Ile133, Leu135, Ser108, Gly112, Arg115

A estrutura bicíclica característica dos sesquiterpenos avaliados, aliada às interações hidrofóbicas favoráveis, pode ter contribuído para a maior afinidade observada com o receptor NMDA. Esses resultados reforçam o potencial desses compostos e poderão ser úteis no planejamento racional de novos agentes anticonvulsivantes.

4.4 Cálculos DFT

4.4.1 Análise dos Orbitais de fronteira (FMOs)

As energias dos orbitais moleculares de fronteira HOMO e LUMO estão frequentemente associadas à capacidade de uma molécula doar e aceitar elétrons, respectivamente. A análise desses orbitais e do intervalo de energia entre eles é fundamental para prever a reatividade e a estabilidade molecular (246). Moléculas com um grande gap HOMO–LUMO tendem a ser menos reativas, enquanto aquelas com uma diferença menor apresentam maior reatividade. Compostos mais reativos, em geral, têm maior probabilidade de interagir com alvos biológicos (247,248), o que pode se correlacionar com maior atividade biológica (249).

A Figura 4.6 apresenta os orbitais moleculares de fronteira e seus respectivos gaps de energia, calculados no nível B3LYP/6-311++G(d,p)/SMD, para os ligantes com maior afinidade pelos receptores GABA_A e NMDA, conforme identificado no estudo de docking. A análise dos gaps sugere a seguinte ordem de reatividade química: guaiadieno > α -bulneseno ~ δ -cadineno > β -bourboneno.

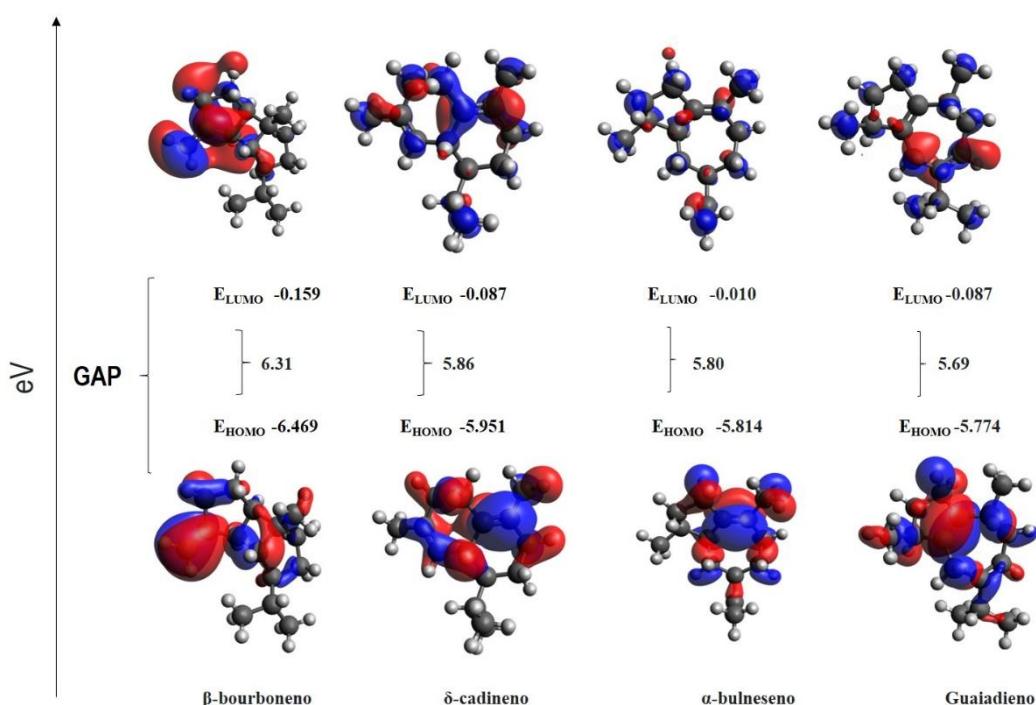


Figura 4.6. Orbitais de fronteira (HOMO-LUMO) e Gap dos compostos com maior afinidade pelos receptores calculados a nível B3LYP/6-311++G(d,p).

O mapeamento dos orbitais de fronteira fornece informações sobre a natureza dos fragmentos moleculares associados aos caracteres doadores e aceitadores de elétrons. Conforme mostrado na Figura 4.6, os orbitais HOMO apresentam contribuições significativas das ligações π C=C e de regiões conjugadas das moléculas. Observa-se que o LUMO do δ -cadineno envolve os anéis e regiões insaturadas, enquanto, para as demais moléculas, esses orbitais encontram-se deslocalizados.

4.4.2 Descritores de reatividade química

A DFT conceitual é uma ferramenta importante para prever a reatividade química de compostos e materiais, além de fornecer subsídios para o design e a seleção de potenciais agentes terapêuticos (250). Os descritores globais de reatividade química dos ligantes com maior afinidade pelos receptores foram calculados e estão apresentados na Tabela 4.6. Os descritores de todos os ligantes encontram-se listados na Tabela B1 (Apêndice B).

Tabela 4.6. Descritores globais de reatividade química dos ligantes com maiores afinidades pelos receptores calculados a nível B3LYP/6-311++G(d,p) em fase aquosa.

Compostos	Descritores de reatividade (eV)					
	(I)	(A)	(μ)	(η)	(x)	(ω)
α -bulneseno	5,81	0,01	-2,91	2,90	2,91	1,46
δ -cadineno	5,95	0,09	-3,02	2,93	3,02	1,55
β -bourboneno	6,47	0,16	-3,31	3,16	3,31	1,74
Guaiadieno	5,77	0,09	-2,93	2,84	2,93	1,51
Diazepam	6,48	1,75	-4,12	2,36	4,12	0,21
Cetamina	5,94	0,90	-3,42	2,52	3,42	0,20

O potencial de ionização (IP) e a afinidade eletrônica (EA) indicam, respectivamente, a capacidade da molécula de doar e aceitar elétrons (251). Os valores de IP de todos os compostos estudados foram superiores aos de EA, indicando que a remoção de um elétron é energeticamente menos favorável do que sua adição. O δ -cadineno apresentou os maiores valores de energia de ionização e afinidade eletrônica entre os compostos, o que indica uma maior capacidade de aceitar elétrons, coerente com sua maior eletronegatividade.

A dureza química é uma medida da resistência de uma molécula à deformação de sua nuvem eletrônica sob pequenas perturbações durante processos químicos (252). De modo geral, moléculas com alta dureza são menos polarizáveis e, portanto, mais estáveis. Nesse contexto, β -bourboneno apresentou a maior dureza, sendo o composto com maior estabilidade química. Embora fármacos consagrados como diazepam e cetamina tenham exibido menor dureza, a alta dureza do β -bourboneno pode representar uma vantagem importante em termos de estabilidade metabólica, baixa toxicidade reacional e maior resistência à degradação, características desejáveis no desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes. Ademais, mesmo com maior dureza, o β -bourboneno demonstrou afinidade significativa no docking molecular, evidenciando que sua estabilidade não compromete a capacidade de interação com alvos relevantes, e pode, inclusive, contribuir para um perfil farmacocinético mais favorável.

Os valores menos negativos de potencial químico (μ) observados para os compostos naturais indicam uma menor tendência à doação eletrônica, o que pode refletir um comportamento químico menos nucleofílico e mais eletrofílico. Essa característica está em consonância com os índices mais elevados de eletrofilicidade (ω), sugerindo uma maior propensão à aceitação eletrônica em sistemas biológicos, o que pode favorecer interações mais seletivas com alvos moleculares específicos.

O índice de eletrofilicidade é uma propriedade associada à capacidade de uma espécie química em atrair elétrons de outras espécies, indicando seu caráter eletrofílico. Moléculas com índice de eletrofilicidade inferior a 0,8 eV são classificadas como eletrofílicos fracos, aquelas entre 0,8 e 1,5 eV como eletrofílicos moderados, e acima de 1,5 eV como eletrofílicos fortes (253,254). Assim, conforme apresentado na Tabela 4.4, α -bulneseno, δ -cadineno e guaiadieno são considerados eletrofílicos moderados, enquanto o β -bourboneno é um eletrófilo forte. Enquanto os fármacos de referência são considerados eletrófilos fracos. Essa diferença é relevante, pois compostos com maior caráter eletrofílico tendem a se ligar com mais eficácia a regiões nucleofílicas dos receptores biológicos, o que pode favorecer interações moleculares estáveis e seletivas.

Além disso, o índice de eletrofilicidade pode estar relacionado à toxicidade geral, uma vez que a toxicidade tende a aumentar com o aumento da eletrofilicidade (255). É importante destacar que tal relação não é absoluta, já que a toxicidade

também depende de diversos outros fatores, como metabolismo, biodisponibilidade e seletividade molecular. Dessa forma, espera-se que guaiadieno, α -bulneseno sejam menos tóxicos que os demais compostos analisados. Apesar de diazepam e clonazepam apresentarem menor toxicidade nos dados analisados, seu histórico de uso e extensa caracterização pré-clínica e clínica contribuem para esse perfil. Ainda assim, os compostos naturais estudados demonstram potencial significativo de segurança, devendo ser considerados para investigações adicionais em contextos farmacológicos.

De modo geral, os compostos com maior afinidade pelos receptores GABA_A e NMDA apresentam maior dureza e caráter eletrofílico moderado, em comparação com as moléculas de menor afinidade (isoborneol, α -pineno, β -pineno e 1,8-cineol) — ver (Apêndice E).

Esses dados podem, portanto, ser utilizados para a seleção preliminar de moléculas orgânicas para estudos de docking molecular, uma vez que estudos demonstram correlação entre descritores eletrônicos derivados da DFT e afinidade de ligação em docking, além de atividade biológica (256).

4.4.3 Mapa de potencial eletrostático molecular

A superfície de potencial eletrostático molecular (do inglês Molecular Electrostatic Potential, MEP) é uma propriedade útil para prever os sítios de reatividade eletrofílica e nucleofílica de uma molécula (257). A região de potencial negativo (cor vermelha ou amarela) indica a área com maior densidade eletrônica e, portanto, maior probabilidade de ataque eletrofílico, enquanto as regiões positivas (coloridas em azul) são mais suscetíveis à adição nucleofílica. As regiões verdes representam sítios neutros. O mapa de potencial eletrostático para os compostos foi obtido via cálculo de distribuição de cargas no nível B3LYP/6-311++G (d, p) para as moléculas otimizadas em fase aquosa usando o modelo SMD.

A análise das superfícies de MEP, apresentada na Figura 4.7, indicam que as regiões de reatividade eletrofílica estão localizadas nas ligações C=C e nos anéis de cinco e seis membros, o que pode ter favorecido a interação com os resíduos de aminoácidos Phe77 no sítio 1 do receptor GABA_A observada no estudo de docking

molecular. Já as regiões positivas estão localizadas nos grupos CH_3 e CH_2 , que atuam como sítios de reatividade nucleofílica.

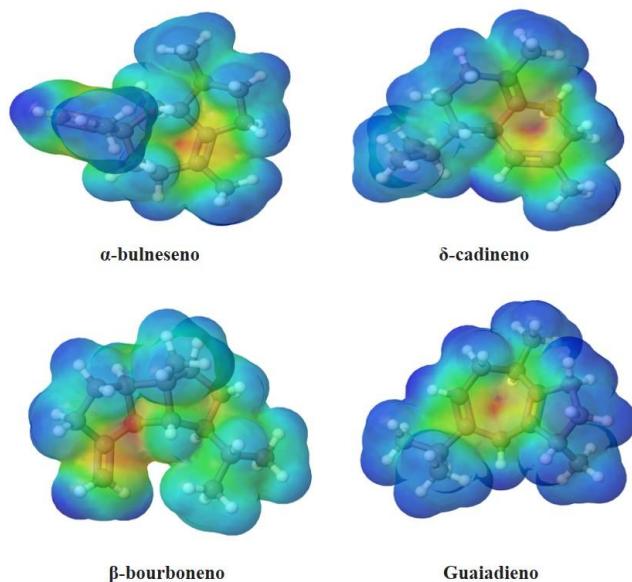


Figura 4.7. Mapas de Potencial Eletrostático Molecular dos compostos calculados a nível DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) com valores de isosuperfícies de 0,002 a.u

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou pela primeira vez as propriedades anticonvulsivantes do óleo essencial das folhas de *C. heliotropifolius* em modelo de camundongos machos. Para corroborar a atividade farmacológica observada, foram realizados estudos de docking molecular dos constituintes presentes no óleo com os receptores GABA_A e NMDA, dois alvos-chave envolvidos na modulação da excitabilidade neuronal. As simulações de docking mostraram que os sesquiterpenos α-bulnesene, δ-cadineno, β-bourboneno e guaiadieno têm altas afinidades pelos receptores, com ênfase no sítio padrão de ligação dos BDZs no GABA_A, possivelmente favorecidas por suas estruturas bicíclicas. As interações ligante-receptor foram predominantemente hidrofóbicas, destacando o papel crucial do aminoácido Phe77 presente na subunidade γ2(E) do receptor GABA_A. No receptor NMDA, os compostos α-bulnesene, δ-cadineno e guaiadieno também demonstraram boas energias de ligação, superando a cetamina, referência clínica para esse alvo. Assim como no GABA_A os compostos foram mantidos no sítio de ligação principalmente por interações hidrofóbicas, sugerindo um potencial de interação favorável. Estudos DFT indicaram que os ligantes mais promissores têm alta estabilidade química e caráter eletrofílico moderado a forte, o que pode contribuir para a afinidade observada. Essas descobertas oferecem um embasamento inicial para potencial uso dos constituintes ativos do óleo como base para o desenvolvimento de novos agentes anticonvulsivantes, embora estudos adicionais sejam necessários para avaliar a segurança e eficácia clínica.

REFERÊNCIAS

1. Angélica R, Corrêa A, Ramos MO, Daliane F, Da S, Freitas AS. Desafios E Inovações Na Descoberta E Desenvolvimento De Fármacos : Uma Análise Das Novas Tecnologias De Alta Performance. **Journal of Business and Management (IOSR-JBM)**.2024;26(10):1–9.
2. Adams CP, Brantner VV. SPENDING ON NEW DRUG DEVELOPMENT. **Wiley InterScience** 2009;19(2010):130–141.
3. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **J Health Econ** [Internet]. 2016;47:20–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
4. Luukkonen S, van den Maagdenberg HW, Emmerich MTM, van Westen GJP. Artificial intelligence in multi-objective drug design. **Curr Opin Struct Biol**. 2023;79:102537. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102537>
5. Leão AB, Brasil RJ. Estratégias de otimização e paralelização massiva do programa de atracamento molecular DockThor programa de atracamento molecular DockThor. Laboratório Nacional de Computação Científica,2022;
6. Rodrigues RP, Mantoani SP, De Almeida JR, Pinsetta FR, Semighini EP, Da Silva VB, et al. Virtual screening strategies in drug design. **Rev Virtual Quim**. 2012;4(6):739–776.
7. Marshall, Garland R. Introduction to Chemoinformatics in Drug Discovery. **Chemoinformatics Drug Discov**. 2004;1–22.
8. Kalyaanamoorthy S, Chen YPP. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discov Today**. 2011;16(17–18):831–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2011.07.006>
9. Weltha L, Reemmer J, Boison D. The role of adenosine in epilepsy. **Brain Res Bull**. 2019;151(November):46–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.11.008>
10. Nieoczym D, Banono NS, Stępnik K, Kaczor AA, Szybkowski P, Esguerra CV, et al. In Silico Analysis, Anticonvulsant Activity, and Toxicity Evaluation of Schisandrin B in Zebrafish Larvae and Mice. **Int J Mol Sci**. 2023;24(16).
11. Fritschy JM, Kiener T, Bouilleret V, Loup F. GABAergic neurons and GABA(A)-

- receptors in temporal lobe epilepsy. **Neurochem Int.** 1999;34(5):435–45.
12. Rabiei Z. Anticonvulsant effects of medicinal plants with emphasis on mechanisms of action. **Asian Pac J Trop Biomed.** 2017;7(2):166–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.028>
 13. De Freitas RM. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia. **Rev Neurociências.** 2001;19(1):128–138.
 14. Barone P, Palma V, de Bartolomeis A, Cicarelli G, Campanella G. Dopaminergic regulation of epileptic activity. **Neurochem Int.** 1992;20(SUPPL.):245–9.
 15. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Dykeman J, Pringsheim T, et al. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, et al. Prevalence and Incidence of Epilepsy: A Systematic Review and Meta-analysis of International Studies. **Neurology.** January 2017; 88(3): 296-303.
 16. Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. **Neuroepidemiology.** 2020;54(2):185–191.
 17. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. Relato oficial da ILAE: Uma definição prática de epilepsia Robert. **Epilepsia.** 2014;55(4):475–482.
 18. Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM, Kim JJ, Hibbs RE. Structure of a human synaptic GABA_A receptor. **Nature.** 2018;559(7712):67–88.
 19. Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA A receptor subtypes. **Nat Rev Drug Disc.** 2011;10(9):685–697. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3502>
 20. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nat Neurosci.** 2002;5(5):405–114.
 21. Fang Y, Wang X. Ketamine for the treatment of refractory status epilepticus. **Seizure.** 2015;30:14–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2015.05.010>
 22. Tassinari CA, Michelucci R, Riguzzi P, Volpi L, Dravet C, Cano JP, et al. The use of diazepam and clonazepam in epilepsy. **Epilepsia.** 1998;39(SUPPL. 1).
 23. Abuelizz HA, El Dib R, Marzouk M, Anouar EH, Maklad YA, Attia HN, et al. Molecular docking and anticonvulsant activity of newly synthesized quinazoline derivatives. **Molecules.** 2017;22(7):1–13.
 24. Hamada Abd-Allah W, Abd El-Mohsen Anwar M, Mohammed ER, Elbaset MA,

- El Moghazy SM. Exploring new cyclohexane carboxamides based GABA agonist: Design, synthesis, biological evaluation, in silico ADME and docking studies. **Bioorg Chem.** 2023;136(April):106561. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106561>
25. Suárez JH. Medicamentos anticonvulsivantes y cambios cognitivos. **Acta Neurológica Colomb.** 2007;23(1):23.
26. Saraiva ME, Ulisses AVRDA, Ribeiro DA, Oliveira LGS De, Macêdo DG De, Sousa FDFS De, et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **J Ethnopharmacol.** 2015;171:141–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.034>
27. Millezi FA, Rossoni DF, Cano IA, Piccoli RH. Sensibilidade de bactérias patogênicas em alimentos a óleos essenciais de plantas medicinais e condimentares TT - Sensitivity of pathogenic bacteria in food to essential oils of medicinal and spice plants. **Hig Aliment.** 2016;30(254/255):117–22. <http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/cqfs5>
28. Anjos TV dos, Tebaldi ND, Mota LCBM, Coelho L. Fontes de silício no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro. **Summa Phytopathol.** 2014;40(4):365–7.
29. Ullah MI, Anwar R, Zia M, Gul B, Kamran S, Kamran SH. Assessment of in vivo antiepileptic potential and phytochemical analysis of *Cassia absus* seed extracts. **Heliyon.** 2023;9(4):e14660. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14660>
30. Vilar Da Fonsêca D, Maia Bezerra Filho CDS, Cardoso Lima T, Nóbrega De Almeida R, Pergentino De Sousa D. Anticonvulsant essential oils and their relationship with oxidative stress in epilepsy. Vol. 9, **Biomolecules**. MDPI AG; 2019.
31. Ueno H, Shimada A, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, et al. Alpha-pinene and dizocilpine (MK-801) attenuate kindling development and astrocytosis in an experimental mouse model of epilepsy. **IBRO Reports.** 2020;9(March):102–14. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.07.007>
32. Lopes KS, Sousa HG, Artur E Silva Filho F, da Silva Neta ER, de Lima SG, Dos Santos Rocha M, et al. Identification of bioactive compounds and cytogenotoxicity of the essential oil from the leaves of *Croton heliotropifolius* Kunth. **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues.** 2022;85(24):1002–18.

- Available from: <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2146618>
- 33. do Nascimento KF, Moreira FMF, Alencar Santos J, Kassuya CAL, Croda JHR, Cardoso CAL, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **J Ethnopharmacol.** 2018;210(May 2017):351–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.030>
 - 34. Oliveira CC de, Oliveira CV de, Grigoletto J, Ribeiro LR, Funck VR, Graunke ACB, et al. Anticonvulsant activity of β-caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy Behav.** 2016 Mar 1;56:26–31.
 - 35. Batatinha MJM, de Souza-Spinosa H, Bernardi MM. Croton zehntneri: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. **J Ethnopharmacol.** 1995;45(1):53–7.
 - 36. Gnanaraj C, Sekar M, Fuloria S, Swain SS, Gan SH, Chidambaram K, et al. In Silico Molecular Docking Analysis of Karanjin against Alzheimer's and Parkinson's Diseases as a Potential Natural Lead Molecule for New Drug Design, Development and Therapy. **Molecules.** 2022;27(9).
 - 37. Kundaikar HS, Sancheti JS, Jain PD, Degani MS, Sathaye S. Docking studies and pharmacological evaluation of antiepileptic activity of phytoconstituents. **Med Chem Res.** 2015 Aug 23;24(8):3296–304.
 - 38. Park JY, Lee Y, Lee HJ, Kwon YS, Chun W. In silico screening of GABA aminotransferase inhibitors from the constituents of *Valeriana officinalis* by molecular docking and molecular dynamics simulation study. **J Mol Model.** 2020;26(9):1–13.
 - 39. Laurent AD, Jacquemin D. TD-DFT benchmarks: A review. **Int J Quantum Chem.** 2013;113(17):2019–39.
 - 40. Lakhera S, Devlal K, Ghosh A, Chowdhury P, Rana M. Modelling the DFT structural and reactivity study of feverfew and evaluation of its potential antiviral activity against COVID-19 using molecular docking and MD simulations. **Chem Pap.** 2022;76(5).
 - 41. Balestrini S, Arzimanoglou A, Blümcke I, Scheffer IE, Wiebe S, Zelano J, et al. The aetiologies of epilepsy. **Epileptic Disord.** 2021;23(1):1–16.
 - 42. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. Classificação das epilepsias da ILAE: Relatório da Comissão de Classificação e

- Terminologia da ILAE. **Epilepsia**. 2017;58(4):512–21.
43. van van Hugte EJH, Schubert D, Nadif Kasri N. Excitatory/inhibitory balance in epilepsies and neurodevelopmental disorders: Depolarizing γ -aminobutyric acid as a common mechanism. **Epilepsia**. 2023;64(8):1975–90.
44. Feng YCA, Howrigan DP, Abbott LE, Tashman K, Cerrato F, Singh T, et al. Ultra-Rare Genetic Variation in the Epilepsies: A Whole-Exome Sequencing Study of 17,606 Individuals. **Am J Hum Genet**. 2019;105(2):267–82.
45. Jaume C, Plecko B. Treatable newborn and infant seizures due to inborn errors of metabolism. **Epileptic Disord**. 2015;17(3):229–42.
46. Dulac O, Plecko B, Gataullina S, Wolf NI. Occasional seizures, epilepsy, and inborn errors of metabolism. **Lancet Neurol**. 2014;13(7):727–39.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70110-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70110-3)
47. Varadkar S, Bien CG, Kruse CA, Jensen FE, Bauer J, Pardo CA, et al. Rasmussen's encephalitis: Clinical features, pathobiology, and treatment advances. **Lancet Neurol**. 2014;13(2):195–205.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70260-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70260-6)
48. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**. 2010;51(4):676–85.
49. Hirsch E, French J, Scheffer IE, Bogacz A, Alsaadi T, Sperling MR, et al. ILAE definition of the Idiopathic Generalized Epilepsy Syndromes: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. **Epilepsia**. 2022;63(6):1475–99.
50. Karakas E, Furukawa H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. 2014;344(6187):992–7.
51. Kessler A, Sahin-Nadeem H, Lummis SCR, Weigel I, Pischetsrieder M, Buettner A, et al. GABAA receptor modulation by terpenoids from Sideritis extracts. **Mol Nutr Food Res**. 2014;58(4):851–62.
52. Gomes JGF, Silva LWMA, Andrade WTB de, Gomes AKM de A, Magalhães CR de S, Mesquita RS de, et al. Ácido Valerênico e seu potencial ansiolítico por meio da interação com receptores do tipo GABAA: um estudo in silico. **Res Soc Dev**. 2021;10(13):e07101320677.

53. Olsen RW, Li GD, Siegel GJ. Gaba. **Basic Neurochem** Princ Mol Cell Med Neurobiol Eighth Ed. 2011;367–76.
54. Cerne R, Lippa A, Poe MM, Smith JL, Jin X, Ping X, et al. GABAkines – Advances in the discovery, development, and commercialization of positive allosteric modulators of GABAA receptors. **Pharmacol Ther**. 2022;234:1–58.
55. Miller PS, Smart TG. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. **Trends Pharmacol Sci**. 2010;31(4):161–74; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.005>
56. Sieghart W. Structure, Pharmacology, and Function of GABAA Receptor Subtypes. **Adv Pharmacol**. 2006;54(06):231–63.
57. Koutroumanidou E, Kimbaris A, Kortsaris A, Bezirtzoglou E, Polissiou M, Charalabopoulos K, et al. Increased Seizure Latency and Decreased Severity of Pentylenetetrazol-Induced Seizures in Mice after Essential Oil Administration. **Epilepsy Res Treat**. 2013;2013:1–6.
58. Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M. British J Pharmacology - 2011 - Sieghart - A novel GABAA receptor pharmacology drugs interacting with the - interface.pdf. 2011.
59. Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M. A novel GABA A receptor pharmacology: Drugs interacting with the $\alpha +\beta$ - interface. **Br J Pharmacol**. 2012;166(2):476–85.
60. Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. Analysis of the set of GABAA receptor genes in the human genome. **J Biol Chem**. 2004;279(40):41422–35.
61. Olsen RW, Sieghart W. GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. **Neuropharmacology**. 2009;56(1):141–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.045>
62. Johnston GAR, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN. Modulation of Ionotropic GABA Receptors by Natural Products of Plant Origin. **Adv Pharmacol**. 2006;54(06):285–316.
63. Benarroch EE. GABAB receptors: Structure, functions, and clinical implications. **Neurology**. 2012;78(8):578–84.
64. Kumar K, Sharma S, Kumar P, Deshmukh R. Therapeutic potential of GABAB receptor ligands in drug addiction, anxiety, depression and other CNS disorders.

- | Pharmacol | Biochem | Behav. | |
|------------------|--|---------------|---|
| | | | 2013;110:174–84. |
| | | | http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.07.003 |
| 65. | McGurk JF, Bennett MVL, Zukin RS. Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in Xenopus oocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(24):9971–4. | | |
| 66. | Bressan RA, Pilowsky LS. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. Rev Bras Psiquiatr. 2003;25(3):177–83. | | |
| 67. | Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, et al. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. Pharmacol Rev. 2010;62(3):405–96. | | |
| 68. | Stroebel D, Buhl DL, Knafo JD, Chanda PK, Green M, Sciabola S, et al. A novel binding mode reveals two distinct classes of NMDA receptor GluN2B-selective antagonists s. Mol Pharmacol. 2016;89(5):541–51. | | |
| 69. | Pham TH, Gardier AM. Fast-acting antidepressant activity of ketamine: highlights on brain serotonin, glutamate, and GABA neurotransmission in preclinical studies. Pharmacol Ther. 2019;199:58–90.
https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.017 | | |
| 70. | Kokane SS, Armant RJ, Bolaños-Guzmán CA, Perrotti LI. Overlap in the neural circuitry and molecular mechanisms underlying ketamine abuse and its use as an antidepressant. Behav Brain Res. 2020;384(February). | | |
| 71. | Kenji Hashimoto. The NMDA Receptors. 2017. 1–8 p. | | |
| 72. | Borges MG. Efeito de antagonistas de receptores nmda extrasinápticos sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em ratos submetidos ao modelo experimental de status epilepticus induzido por lici-pilocarpina. 2013. | | |
| 73. | Porto LA, Siqueira JDS, Seixas LN, Almeida JRGDS, Quintans LJ. O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilepticas - Uma breve revisão. J Epilepsy Clin Neurophysiol. 2007;13(4):169–75. | | |
| 74. | Jo H, Cha B, Kim H, Brito S, Kwak BM, Kim ST, et al. α-Pinene Enhances the Anticancer Activity of Natural Killer Cells via ERK/AKT Pathway. Int J Mol Sci. 2021 Jan 2;22(2):1–13. | | |
| 75. | Vaijanathappa J, Puttaswamygowda J, Bevanhalli R, Dixit S, Prabhakaran P. Molecular docking, antiproliferative and anticonvulsant activities of swertiamarin | | |

- isolated from *Enicostemma axillare*. **Bioorg Chem.** 2020 Jan 1;94.
- 76. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. **Lancet**. 2019;393(10172):689–701. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
 - 77. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, et al. Antiepileptic drugs - Best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**. 2008;49(7):1239–76.
 - 78. Jacob TC, Michels G, Silayeva L, Haydon J, Succol F, Moss SJ. Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABA A receptor trafficking and decreases synaptic inhibition. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2012;109(45):18595–600.
 - 79. Faria JSS, Rossi SV, Andreatta T, Simões VP, Pombo BH, Moreira RB. Benzodiazepínicos: revendo o uso para o desuso. **Rev Med.** 2019;98(6):423–6.
 - 80. Dell'osso B, Lader M. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. **Eur Psychiatry**. 2013;28(1):7–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpsy.2011.11.003>
 - 81. Levy RJ, Krall RL. Treatment of Status Epilepticus with Lorazepam. **Arch Neurol.** 1984;41(6):605–11.
 - 82. Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. **Pharmacol Rev.** 2008;60(3):243–60.
 - 83. Bateson A. Basic Pharmacologic Mechanisms Involved in Benzodiazepine Tolerance and Withdrawal. **Curr Pharm Des.** 2002;8(1):5–21.
 - 84. Gallager DW, Lakoski JM, Gonsalves Rauch SFSL. Chronic benzodiazepine treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity. **Nature**. 1984;308(5954):74–7.
 - 85. Contreras-caicedo G. Medicamento das Epilepsias Medicamento das Epilepsias. 2014;
 - 86. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, et al. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**. 2015;56(10):1515–23.

87. Holtkamp M, Othman J, Buchheim K, Meierkord H. Predictors and prognosis of refractory status epilepticus treated in a neurological intensive care unit. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(4):534–9.
88. Prüss H, Holtkamp M. Ketamine successfully terminates malignant status epilepticus. *Epilepsy Res*. 2008;82(2–3):219–22.
89. Martin BS, Kapur J. A combination of ketamine and diazepam synergistically controls refractory status epilepticus induced by cholinergic stimulation. *Epilepsia*. 2008;49(2):248–55.
90. Borris DJ, Bertram EH, Kapur J. Ketamine controls prolonged status epilepticus. *Epilepsy Res*. 2000;42(2–3):117–22.
91. Pollmann AS, Murphy AL, Bergman JC, Gardner DM. Deprescribing benzodiazepines and Z-drugs in community-dwelling adults: A scoping review. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2015;16(1):1–12. <http://dx.doi.org/10.1186/s40360-015-0019-8>
92. Veiga VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas Medicinais: Cura segura? *Quim Nova*. 2005;28(3):519–28.
93. Rose C, Gomes J. Orientações Sobre O Uso De Fitoterápicos e Plantas Medicinais. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa*. 2022
94. Rafieian-Kopaei M, Sewell RDE. The history and ups and downs of herbal medicines usage. *J HerbMed Pharmacol J homepage J HerbMed Pharmacol*. 2014;3(1):1–3. <http://www.herbmedpharmacol.com>
95. Berlinck RGS, De Borges WS, Scotti MT, Vieira PC. The chemistry of natural products in Brazil in the XXI century. *Quim Nova*. 2017;40(6):706–10.
96. Ribeiro D., Macêdo DG, Oliveira LGS, Saraiva ME, Oliveira SF, Souza MMA, et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Rev Bras Plantas Med*. 2014;16(4):912–30.
97. MORAES EF, MEZZOMO TR, OLIVEIRA VB. Conhecimento e Uso de Plantas Medicinais por Usuários de Unidades Básicas de Saúde na Região de Colombo, PR. *Rev Bras Ciências da Saúde*. 2018;22(1):57–64.
98. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2006. 1–60 p.
99. Ministério da saúde, Secretaria de atenção á saúde, Departamento de Atenção

- Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. **Diário da República**, 2.^a série - n.^o 45 (05-03-2013). 2015. 8174–8175 p.
100. Swerdlow JL. Plants that heal. **Nature Medicine** 2010.
 101. Huang J, Liu C, Duan S, Lin J, Luo Y, Tao S, et al. Gigantol inhibits proliferation and enhances DDP-induced apoptosis in breast-cancer cells by downregulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Life Sci.** 2021;274(December 2020):119354. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119354>
 102. Kim JH, Kim SY, Lee SY, Jang CG. Antidepressant-like effects of Albizzia julibrissin in mice: Involvement of the 5-HT1A receptor system. **Pharmacol Biochem Behav.** 2007;87(1):41–7.
 103. Abou Baker DH, Amarowicz R, Kandeil A, Ali MA, Ibrahim EA. Antiviral activity of Lavandula angustifolia L. and Salvia officinalis L. essential oils against avian influenza H5N1 virus. **J Agric Food Res.** 2021;4(December 2020):100135. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100135>
 104. Ullah MI, Anwar R, Zia M, Gul B, Kamran S, Kamran SH. Assessment of in vivo antiepileptic potential and phytochemical analysis of Cassia absus seed extracts. **Heliyon.** 2023 Apr 1;9(4).
 105. Bahr TA, Rodriguez D, Beaumont C, Allred K. The effects of various essential oils on epilepsy and acute seizure: A systematic review. **Evidence-based Complement Altern Med.** 2019;2019.
 106. Goes TC, Antunes FD, Alves PB, Teixeira-Silva F. Effect of sweet orange aroma on experimental anxiety in humans. **J Altern Complement Med.** 2012;18(8):798–804.
 107. Tran KN, Nguyen NPK, Nguyen LTH, Shin HM, Yang IJ. Screening for Neuroprotective and Rapid Antidepressant-like Effects of 20 Essential Oils. **Biomedicines.** 2023;11(5).
 108. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med.** 2006;27(1):1–93.
 109. Silveira PF da, Bandeira MAM, Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev Bras Farmacogn.** 2008;18(4):618–26.
 110. da Silva Brito SS, Silva F, Malheiro R, Baptista P, Pereira JA. Croton argyrophyllus Kunth and Croton heliotropiifolius Kunth: Phytochemical

- characterization and bioactive properties. **Ind Crops Prod.** 2018;113(January):308–15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.044>
111. Payo A, Dominicis M, Mayor J, Oquendo M, Sarduy R. Tamizaje Fitoquímico Preliminar De Especies. **Rev Cuba Farm.** 2001;35(3):203–6. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475152001000300008&script=sci_arttext&tlang=en
112. Silva JS, Sales MF de, Gomes AP de S, Carneiro-Torres DS. Sinopse das espécies de Croton L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Bot Brasilica.** 2010;24(2):441–53.
113. Silva JS, Sales MF, Carneiro-Torres DS. O gênero croton (euphorbiaceae) na microrregião do vale do ipanema, PERNAMBUCO, BRASIL. 2009;880–901.
114. Riina R, Berry PE, van Ee BW. Molecular phylogenetics of the dragon's blood Croton section Cyclostigma (Euphorbiaceae): A polyphyletic assemblage unraveled. **Syst Bot.** 2009;34(2):360–74.
115. Salatino A, Salatino M, Negri G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of. **J Braz Chem Soc.** 2007;18(1):11–33.
116. Marinho MGV, Silva CC, Andrade LHC. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Rev Bras Plantas Med.** 2011;13(2):170–80.
117. De Medeiros PM, Ladio AH, Albuquerque UP. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **J Ethnopharmacol.** 2013;150(2):729–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.026>
118. Dória GAA, Silva WJ, Carvalho GA, Alves PB, Cavalcanti SCH. A study of the larvicidal activity of two Croton species from northeastern Brazil against Aedes aegypti. **Pharm Biol.** 2010;48(6):615–20.
119. de Alencar Filho JMT, Araújo LDC, Oliveira AP, Guimarães AL, Pacheco AGM, Silva FS, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of croton heliotropifolius in different seasons of the year. **Rev Bras Farmacogn.** 2017;27(4):440–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.004>
120. Nardi GM, Felippi R, DalBó S, Siqueira-Junior JM, Arruda DC, Delle Monache F, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Croton celtidifolius bark. **Phytomedicine.** 2003;10(2–3):176–84.

121. Vasco-dos-Santos DR, dos Santos JV, de Andrade WM, dos Santos-Lima TM, Lima LN, Dias-Lima AG, et al. Antiparasitic plants used by the Kantaruré-Batida indigenous community (NE-Brazil): Ethnobotany and local knowledge-erosion risks. **Ambient e Soc.** 2018;21.
122. Fernandes PA de S, Silva JCP da, Lima Sales D, Ribeiro PRV, Sousa de Brito E, Kerntopf MR, et al. Chemical constituents and biological activities of croton heliotropiifolius kunth. **Antibiotics.** 2021;10(9):1–18.
123. Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, et al. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_A receptors: Molecular mechanism and subunit specificity. **Neuropharmacology.** 2007;53(1):178–87.
124. Murphy K, Kubin ZJ, Shepherd JN, Ettinger RH. Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. **Phytomedicine.** 2010;17(8–9):674–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.020>
125. Maia LS, Sousa LQR, Neto APA, Andrade MA, Silva RM, Medeiros CIS, et al. Potencial fitoterápico da valeriana officinalis aplicada à odontologia. **Journal of Medicine and Health Promotion.** 2019;4(4):1291–7.
126. Silva LB, Torres EB, Silva KF, Souza JSN, Lopes MS, Andrade LH, et al. Toxicity of Ethanolic Extract of Crton heliotropiifolius in Weevil Populations of Stored Maize Grains. **Journal of Entomology.** 9 (6):413-421, 2012.
127. Queiroz MMF, Queiroz EF, Zeraik ML, Marti G, Favre-Godal Q, Simões-Pires C, et al. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of Croton heliotropiifolius. **Phytochem Lett.** 2014;10:Ixxxviii–xciii.
128. Ngo Bum E, Ngah E, Ngo Mune RM, Ze Minkoulou DM, Talla E, Moto FCO, et al. Decoctions of Bridelia micrantha and Croton macrostachyus may have anticonvulsant and sedative effects. **Epilepsy Behav.** 2012;24(3):319–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.03.028>
129. Neves I de A, da Camara CAG. Volatile constituents of two Croton species from Caatinga biome of Pernambuco-Brasil. **Rec Nat Prod.** 2012;6(2):161–5.
130. Marques RB, Barreto Sousa MDD, de Sousa Santos W, Ferreira de Barros Leite N, Morais Sobreiro Lima E, Lima Soares A, et al. Pharmacokinetic and toxicological prediction of the chemical constituents of the essential oil of the leaves of Croton heliotropiifolius Kunth. **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues.** 2023;

131. Bukvicki D, Gottardi D, Veljic M, Marin PD, Vannini L, Guerzoni ME. Identification of volatile components of liverwort (*Porella cordaeana*) extracts using GC/MS-SPME and their antimicrobial activity. **Molecules**. 2012;17(6):6982–95.
132. Silva L, Oniki GH, Agripino DG, Moreno PRH, Young CM, Mayworm MAS, et al. Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) **Nicolson & Jarvis (Vitaceae)**. 2007;17(3):361–7.
133. Juergens UR. Anti-inflammatory Properties of the Monoterpene 1,8-cineole: Current Evidence for Co-medication in Inflammatory Airway Diseases. **Drug Research**, 64(12), 638–646 | 10.1055/s-0034-1372609. **Drug Res** 2014;64(12):638–46. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1055/s-0034-1372609>
134. Bahi A, Al Mansouri S, Al Memari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Ojha S. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiol Behav**. 2014;135:119–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.003>
135. Katsuyama S, Mizoguchi H, Kuwahata H, Komatsu T, Nagaoka K, Nakamura H, et al. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **Eur J Pain** (United Kingdom). 2013;17(5):664–75.
136. De Sousa DP, Quintans L, De Almeida RN. Evolution of the anticonvulsant activity of α -terpineol. **Pharm Biol**. 2007;45(1):69–70.
137. Vatanparast J, Bazleh S, Janahmadi M. The effects of linalool on the excitability of central neurons of snail *Caucasotachea atrolabiata*. **Comp Biochem Physiol Part-C Toxicol Pharmacol**. 2017;192:33–9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.12.004>
138. Zamyad M, Abbasnejad M, Esmaeili-Mahani S, Mostafavi A, Sheibani V. The anticonvulsant effects of ducrosia anethifolia (boiss) essential oil are produced by its main component alpha-pinene in rats. **Arq Neuropsiquiatr**. 2019;77(2):106–14.
139. De Sousa DP, Nóbrega FFF, De Moraes LCSL, De Almeida RN. Evaluation of the anticonvulsant activity of terpinen-4-ol. **Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci**. 2009;64(1–2):1–5.
140. Eddin LB, Jha NK, Meeran MFN, Kesari KK, Beiram R, Ojha S. Neuroprotective potential of limonene and limonene containing natural products. **Molecules**.

- 2021;26(15):1–26.
141. Viana GS de B, Vale TG, Silva CMM, Matos FJ de A. Anticonvulsant Activity of Essential Oils and Active Principles from Chemotypes of *Lippia alba*(Mill.) N.E. Brown. **tiChemical Pharm Bull.** 2000;23(43):1314.
 142. Masoumi-Ardakani Y, Mandegary A, Esmaeilpour K, Najafipour H, Sharififar F, Pakravanan M, et al. Chemical composition, anticonvulsant activity, and toxicity of essential oil and methanolic extract of *Elettaria cardamomum*. **Planta Med.** 2016;82(17):1482–6.
 143. Oliveira CC de, Oliveira CV de, Grigoletto J, Ribeiro LR, Funck VR, Graunke ACB, et al. Anticonvulsant activity of β-caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy Behav.** 2016;56:26–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.040>
 144. Stanzione F, Giangreco I, Cole JC. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. 1st ed. Vol. 60, Progress in Medicinal Chemistry. Elsevier B.V.; 2021. 273–343 p. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
 145. Kuntz ID, Jeffrey BM, Langridge sTUART JOR, Ferrin TE. A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. **J. Mol. Bid.** 1982;161, 269–288.
 146. Chen T, Shu X, Zhou H, Beckford FA, Misir M. Algorithm selection for protein–ligand docking: strategies and analysis on ACE. **Sci Rep.** 2023;13(1):1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35132-5>
 147. Agarwal S, Mehrotra R. Mini Review_ An overview of Molecular Docking. **JSM Chem.** 2016;4(2):1024–8. https://www.researchgate.net/profile/Shweta-Agarwal7/publication/303897563_Mini_Review_An_overview_of_Molecular_Docking/links/575b9fb108aed884620da00a/Mini-Review-An-overview-of-Molecular-Docking.pdf
 148. Block P, Sottriffer CA, Dramburg I, Klebe G. AffinDB: a freely accessible database of affinities for protein-ligand complexes from the PDB. **Nucleic Acids Res.** 2006;34(Database issue):522–6.
 149. Dias R, Filgueira De Azevedo W. Molecular Docking Algorithms. Vol. 9, **Current Drug Targets.** 2008.
 150. Onodera K, Satou K, Hirota H. Evaluations of molecular docking programs for virtual screening. **J Chem Inf Model.** 2007;47(4):1609–18.

151. Gupta M, Sharma R, Kumar A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? **Comput Biol Chem.** 2018;76:210–7. <https://doi.org/10.1016/j.compbiochem.2018.06.005>
152. Janssen PAJ, Lewi PJ, Arnold E, Daeyaert F, De Jonge M, Heeres J, et al. In search of a novel anti-HIV drug: Multidisciplinary coordination in the discovery of 4-[[4-[[4-[(1E)-2-cyanoethenyl]-2,6-dimethylphenyl]amino]-2-pyrimidinyl]amino]benzonitrile (R278474, rilpivirine). **J Med Chem.** 2005;48(6):1901–9.
153. Von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. **Nature.** 1993;363(6428):418–23.
154. Liu M, Wang S. MCDOCK: A Monte Carlo simulation approach to the molecular docking problem. **J Comput Aided Mol Des.** 1999;13(5):435–51.
155. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J Mol Biol.** 1997;267(3):727–48.
156. Trott O, Olson JA. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **J Comput Chem.** 2009;31:455–61.
157. Nursamsiar, Siregar M, Awaluddin A, Nurnahari N, Nur S, Febrina E, et al. Molecular docking and molecular dynamic simulation of the aglycone of curculigoside a and its derivatives as alpha glucosidase inhibitors. **Rasayan J Chem.** 2020;13(1):690–8.
158. Bell EW, Zhang Y. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **J Cheminform.** 2019;11(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>
159. Kontoyianni M, McClellan LM, Sokol GS. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. **J Med Chem.** 2004;47(3):558–65.
160. Dugan N, Erkoç Ş. Genetic algorithms in application to the geometry optimization of nanoparticles. **Algorithms.** 2009;2(1):410–28.
161. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J Comput Chem.** 1998;19(14):1639–62.
162. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and Validation

- of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. **J Mol Biol.** 1997;120(4):727–48.
- 163. Trott O, Olson AJ. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **J Comput Chem.** 2009;31:456–61.
 - 164. Rarey M, Kramer B, Lengauer T, Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **J Mol Biol.** 1996;261(3):470–89.
 - 165. Alonso H, Bliznyuk AA, Gready JE. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Med Res Rev.** 2006;26(5):531–68.
 - 166. McMartin C, Bohacek RS. QXP: Powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. **J Comput Aided Mol Des.** 1997;11(4):333–44.
 - 167. Abagyan, R., Kuznetsov D, Totrov M. ICM - New Method for Protein Modeling and Design: Applications to Docking and Structure Prediction from. **J Comput Chem.** 1994;15(5):488–506.
 - 168. Li Y, Liu Z, Li J, Han L, Liu J, Zhao Z, et al. Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 1. compilation of the test set. **J Chem Inf Model.** 2014;54(6):1700–16.
 - 169. Huang SY, Grinter SZ, Zou X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and future directions. **Phys Chem Chem Phys.** 2010;12(40):12899–908.
 - 170. Wang R, Lai L, Wang S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **J Comput Aided Mol Des.** 2002;16(1):11–26.
 - 171. Hans-Joachim Böhm. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. **J Comput Aided Mol Des.** 1994;8:243–56.
[Ahttps://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00126743.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00126743.pdf)
 - 172. Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini G V., Mee RP. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **J Comput Aided Mol Des.** 1997;11(5):425–45.
 - 173. Verdonk ML, Berdini V, Hartshorn MJ, Mooij WTM, Murray CW, Taylor RD, et al. Virtual screening using protein-ligand docking: Avoiding artificial enrichment. **J Chem Inf Comput Sci.** 2004;44(3):793–806.

174. Guedes IA, de Magalhães CS, Dardenne LE. Receptor-ligand molecular docking. **Biophys Rev.** 2014;6(1):75–87.
175. Meng EC, Shoichet BK, Kuntz ID. Automated docking with grid-based energy evaluation. **J Comput Chem.** 1992;13(4):505–24.
176. Miyazawa S, Jernigan RL. Estimation of effective interresidue contacts energies from protein crystal structures. **Macromol.** 1985;18:534–52. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
177. Tanaka S, Scheraga HA. Medium-and Long-Range Interaction Parameters between Amino Acids for Predicting Three-Dimensional Structures of Proteins. **Macromolecules.** 1976;9(6):945–50.
178. Sippl MJ. Calculation of conformational ensembles from potentials of mena force. An approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins. **J Mol Biol.** 1990;213(4):859–83.
179. Gohlke H, Hendlich M, Klebe G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. **J Mol Biol.** 2000;295(2):337–56.
180. Yang CY, Wang R, Wang S. M-score: A knowledge-based potential scoring function accounting for protein atom mobility. **J Med Chem.** 2006;49(20):5903–11.
181. Muegge I. PMF scoring revisited. **J Med Chem.** 2006;49(20):5895–902.
182. A. G M, M. S. Borges W. Uma revisão da Teoria do Funcional de Densidade (TFD): Métodos e Aplicação em Agentes de Contraste. **Rev Process Químicos.** 2021;15(29):61–8.
183. Morgan NH, Custodio R. Teoria do Funcional da Densidade. **Quimica Nova.** 1994. p. 44–55.
184. Thomas LH. The calculation of atomic fields. **Math Proc Cambridge Philos Soc.** 1927;23(5):542–8.
185. Fermi E. Eine statistische Methode zur Bestimmung einiger Eigenschaften des Atoms und ihre Anwendung auf die Theorie des periodischen Systems der Elemente. **Zeitschrift für Phys.** 1928;48(1–2):73–9.
186. HOHENBERGt P, KonN W. The convolution equation of Choquet and Deny on [IN]-groups. **Integr Equations Oper Theory.** 1964;136(4).
187. Bickelhaupt FM, Baerends EJ. Kohn-Sham Density Functional Theory: Predicting and Understanding Chemistry. 2000;15:1–86.

188. Schindlmayr A, Godby RW. Density-functional theory and the v-representability problem for model strongly correlated electron systems. **Phys Rev B.** 1995;51(16):10427–35.
189. Marques MAL, Botti S. O que é e para serve a teoria dos funcionais da densidade? **Gaz da Física.** 2006;29(4):10–5.
190. Orio M, Pantazis DA, Neese F. Density functional theory. **Photosynth Res.** 2009;102(2):443–53.
191. Morgan NH, Custódio R. Funções de base: o ajuste variacional. **Rev Chemkeys.** 2018;(2):1–11.
192. Jensen F. Introduction to Computational Chemistry. 2007. 1–583 p.
193. Aquino M, M. S. Borges W. Uma revisão da Teoria do Funcional de Densidade (TFD): Métodos e Aplicação em Agentes de Contraste. **Rev Process Químicos.** 2021;15(29):61–8.
194. Krishnan R, Binkley JS, Seeger R, Pople JA. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. **J Chem Phys.** 1980;72(1):650–4.
195. Kendall RA, Dunning TH, Harrison RJ. Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions. **J Chem Phys.** 1992;96(9):6796–806.
196. Curtiss LA, Raghavachari K, Trucks GW, Pople JA. Gaussian-2 theory for molecular energies of first- and second-row compounds. **J Chem Phys.** 1991;94(11):7221–30.
197. Baboul AG, Curtiss LA, Redfern PC, Raghavachari K. Gaussian-3 theory using density functional geometries and zero-point energies. **J Chem Phys.** 1999;110(16):7650–7.
198. Curtiss LA, Redfern PC, Raghavachari K. Gaussian-4 theory using reduced order perturbation theory. **J Chem Phys.** 2007;127(12).
199. Curtiss LA, Redfern PC, Raghavachari K. Gn theory. **Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.** 2011;1(5):810–25.
200. Riaz R, Parveen S, Rashid M, Shafiq N. Combined Experimental and Theoretical Insights: Spectroscopic and Molecular Investigation of Polyphenols from *Fagonia indica* via DFT, UV-vis, and FT-IR Approaches. **ACS Omega.** 2024;9(1):730–40.

201. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colic-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Am Phys Soc.** 1988;37(11):785–9.
202. Ziegler T. The 1994 Alcan Award Lecture Density functional theory as a practical tool in studies of organometallic energetics and kinetics. **Beating the heavy metal blues with DFT.** 1995;(14).
203. Ceperley DM, Alder BJ. Ground state of the electron gas by a stochastic method. **Phys Rev Lett.** 1980;45(7):566–9.
204. Perdew JP, Zunger A. Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. **Phys Rev B.** 1981;23(10):5048–79.
205. Perdew PJ, Burke K, Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation Made Simple John. **Phys Rev Lett.** 1996;77(18):3865-.
206. Silva CP da. Computação de alto desempenho com placas gráficas para acelerar o processamento da teoria do funcional da densidade. Pontifícia Univ Católica do Rio Janeiro. 2010;(1):88.
207. Pinto LMC. A teoria do funcional da densidade na caracterização de fases intermetálicas ordenadas. 2009;
208. A.D. Becke. Density-fnnctional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **J Chem Phys.** 1988;38(4):3098–100.
209. John P. . Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. **Pay Perform Heal Care Methods Approaches.** 2011;(June):341–70.
210. Perdew JP, Burke K. Generalized gradient approximation for the exchange-correlation hole of a many-electron system. **Phys Rev B - Condens Matter Mater Phys.** 1996;54(23):16533–9.
211. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **J Chem Phys.** 1993;98(7):5648–52.
212. Zhao Y, Truhlar DG. A new local density functional for main-group thermochemistry, transition metal bonding, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. **J Chem Phys.** 2006;125(19).
213. Zhao Y, Truhlar DG. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of

- four M06-class functionals and 12 other function. **Theor Chem Acc.** 2008;120(1–3):215–41.
- 214. Zhao Y, Truhlar DG. Benchmark Databases for Nonbonded Interactions and Their Use To Test Density Functional Theory. **J Chem Theory Compu.** 2005;415–32.
 - 215. Neese F. Software update: The ORCA program system—Version 5.0. **Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.** 2022;12(5):1–15.
 - 216. Marenich A V., Cramer CJ, Truhlar DG. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. **J Phys Chem B.** 2009;113(18):6378–96.
 - 217. Hanwell MD, DonaldECurtis, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Adv Math (N Y).** 2012;4:17.
 - 218. Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>. 2012;
 - 219. Mulliken RS. A new electroaffinity scale; Together with data on valence states and on valence ionization potentials and electron affinities. **J Chem Phys.** 1934;2(11):782–93.
 - 220. Parr RG, Pearson RG. Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity. **J Am Chem Soc.** 1983;105(26):7512–6.
 - 221. Parr RG, Donnelly RA, Levy M, Palke WE. Electronegativity: The density functional viewpoint. **J Chem Phys.** 1977;68(8):3801–7.
 - 222. Parr RG, Szentpály L V., Liu S. Electrophilicity index. **J Am Chem Soc.** 1999;121(9):1922–4.
 - 223. Domingo LR, Ríos-Gutiérrez M, Pérez P. Applications of the conceptual density functional theory indices to organic chemistry reactivity. **Molecules.** 2016;21(6).
 - 224. Gasteiger J, Marsili M. A new model for calculating atomic charges in molecules. **Tetrahedron Lett.** 1978;19(34):3181–4.
 - 225. Kim JJ, Gharpure A, Teng J, Zhuang Y, Howard RJ, Zhu S, et al. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. **Nature.** 2020;585(7824):303–8. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2654-5>
 - 226. Meng EC, Goddard TD, Pettersen EF, Couch GS, Pearson ZJ, Morris JH, et al.

- UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. **Protein Sci.** 2023;32(11):1–13.
227. Onufriev A V., Alexov E. Protonation and pK changes in protein-ligand binding. **Q Rev Biophys.** 2013;46(2):181–209.
228. Barros RO, Junior FLCC, Pereira WS, Oliveira NMN, Ramos RM. Interaction of Drug Candidates with Various SARS-CoV-2 Receptors: An in Silico Study to Combat COVID-19. **J Proteome Res.** 2020;19(11):4567–75.
229. Roman AL, Mark BS. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **J Chem Inf Model.** 2011;51:2778–86.
230. BIOVIA Discovery Studio Visualizer. BIOVIA Dassault Systèmes. 2020;
231. Nur S, Hanafi M, Setiawan H, Nursamsiar, Elya B. In silico evaluation of the dermal antiaging activity of Molineria latifolia (Dryand. ex W.T. Aiton) Herb. Ex Kurz compounds. **J Pharm Pharmacogn Res.** 2023;11(2):325–45.
232. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. **Methods Mol Biol.** 2008;443:365–82.
233. Ballante F, Kooistra AJ, Kampen S, de Graaf C, Carlsson J. Structure-Based Virtual Screening for Ligands of G Protein–Coupled Receptors: What Can Molecular Docking Do for You?S. **Pharmacol Rev.** 2021;73(4).
234. Fan J, Fu A, Zhang L. Progress in molecular docking. **Quant Biol.** 2019;7(2):83–89.
235. Vicente De Lima C, Moda DB, Romanello L. Modelagem molecular de isoformas e docagem molecular da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) de Schistosoma mansoni. **Luminária.** 2020; 22, n. 01:35-49
236. Sharma J, Kumar Bhardwaj V, Singh R, Rajendran V, Purohit R, Kumar S. An in-silico evaluation of different bioactive molecules of tea for their inhibition potency against non structural protein-15 of SARS-CoV-2. **Food Chem.** 2021;346(December2020):128933.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128933>
237. Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M. novel GABA_A receptor pharmacology drugs interacting with the - **British Journal of Pharmacology.** 2011. p. 476–85.
238. Watt EE, Betts BA, Kotey FO, Humbert DJ, Griffith TN, Kelly EW, et al. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABA_A receptor

- with the intravenous agent, propofol. **Eur J Pharmacol.** 2008;590(1–3):120–6.
239. Mu H, Chen S, Liu F, Xiao J, Huang H, Zhang Y, et al. Stereoselective interactions of lactic acid enantiomers with HSA: Spectroscopy and docking application. **Food Chem.** 2019;270(February 2018):429–4435.
240. Guimarães CRW. The many contributions to protein-ligand binding: Implications in drug design. **Rev Virtual Quim.** 2012;4(4):348–364.
241. Sathya B, Prasath M, Selvapandian M, Prabha K. Vibrational Analysis (FT-IR and FT-Raman Spectra) and Molecular Docking Evaluation of MPTB in GABA Receptor. **J Clust Sci.** 2019;30(4):1025–35. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01562-3>
242. Nipun TS, Khatib A, Ibrahim Z, Ahmed QU, Redzwan IE, Primaharinastiti R, et al. Gc-ms-and nmr-based metabolomics and molecular docking reveal the potential alpha-glucosidase inhibitors from psychotria malayana jack leaves. **Pharmaceuticals.** 2021;14(10).
243. Amundarain MJ, Caffarena ER, Costabel MD. How does α 1Histidine102 affect the binding of modulators to α 1 β 2 γ 2GABAAreceptors? molecular insights from in silico experiments. **Phys Chem Chem Phys.** 2021;23(6):3993–4006.
244. Ghasemi M, Schachter SC. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: A review. **Epilepsy Behav.** 2011;22(4):617–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.07.024>
245. Sobreira Dantas Nóbrega de Figuêiredo FR, Monteiro ÁB, Alencar de Menezes IR, Sales V dos S, Petícia do Nascimento E, Kelly de Souza Rodrigues C, et al. Effects of the *Hyptis martiusii* Benth. leaf essential oil and 1,8-cineole (eucalyptol) on the central nervous system of mice. **Food Chem Toxicol.** 2019;133(September):110802. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110802>
246. Yasmin F, Nazli ZIH, Shafiq N, Aslam M, Bin Jardan YA, Nafidi HA, et al. Plant-Based Bioactive Phthalates Derived from *Hibiscus rosa-sinensis*: As In Vitro and In Silico Enzyme Inhibition. **ACS Omega.** 2023;8(36):32677–89.
247. Patial PK, Cannoo DS. Phytochemical profile, antioxidant potential and DFT study of *Araucaria columnaris* (G. Forst.) Hook. Branch extracts. **Nat Prod Res.** 2021;35(22):4611–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1696330>
248. Zia M, Parveen S, Shafiq N, Rashid M, Farooq A, Dauelbait M, et al. Exploring *Citrus sinensis* Phytochemicals as Potential Inhibitors for Breast Cancer Genes

- BRCA1 and BRCA2 Using Pharmacophore Modeling, Molecular Docking, MD Simulations, and DFT Analysis. **ACS Omega.** 2024;9(2):2161–82.
249. Kökbudak Z, Saracoglu M, Akkoç S, Çimen Z, Yilmazer MI, Kandemirli F. Synthesis, cytotoxic activity and quantum chemical calculations of new 7-thioxopyrazolo[1,5-f]pyrimidin-2-one derivatives. **J Mol Struct.** 2020;1202:127261. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127261>
250. Liu S, Parr RG. Second-order density-functional description of molecules and chemical changes. **J Chem Phys.** 1997;106(13):5578–86.
251. Ozdemir UO, İlbiz F, Balaban Gunduzalp A, Ozbek N, Karagoz Genç Z, Hamurcu F, et al. Alkyl sulfonic acid hydrazides: Synthesis, characterization, computational studies and anticancer, antibacterial, anticarbonic anhydrase II (hCA II) activities. **J Mol Struct.** 2015;1100(hCA II):464–74.
252. Yang W, Parr RG. Hardness, softness, and the fukui function in the electronic theory of metals and catalysis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1985;82(20):6723–6.
253. Lakhera S, Devlal K, Ghosh A, Chowdhury P, Rana M. Modelling the DFT structural and reactivity study of feverfew and evaluation of its potential antiviral activity against COVID-19 using molecular docking and MD simulations. **Chem Pap.** 2022;76(5):2759–76. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02067-6>
254. Domingo LR, Aurell MJ, Pérez P, Contreras R. Quantitative characterization of the global electrophilicity power of common diene/dienophile pairs in Diels-Alder reactions. **Tetrahedron.** 2002;58(22):4417–23.
255. Roy DR, Parthasarathi R, Maiti B, Subramanian V, Chattaraj PK. Electrophilicity as a possible descriptor for toxicity prediction. **Bioorganic Med Chem.** 2005;13(10):3405–12.
256. Khan S, Ullah H, Taha M, Rahim F, Sarfraz M, Iqbal R, et al. Synthesis, DFT Studies, Molecular Docking and Biological Activity Evaluation of Thiazole-Sulfonamide Derivatives as Potent Alzheimer's Inhibitors. **Molecules.** 2023;28(2).
257. Bruna F, Fernández K, Urrejola F, Touma J, Navarro M, Sepúlveda B, et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity of Laureliopsis philippiana essential oil of Chile, study in vitro and in silico. **Arab J Chem.** 2022;15(12).

Apêndice A*

RESULTADOS DO DOCKING MOLECULAR

Lista de Figuras

Figura A1. Representações bidimensionais das interações moleculares entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio 2 do receptor GABA_A.

Figura A6. Representações bidimensionais das interações moleculares entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio 3 do receptor GABA_A.

Figura A3. Representações bidimensionais das interações moleculares entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio 4 do receptor GABA_A.

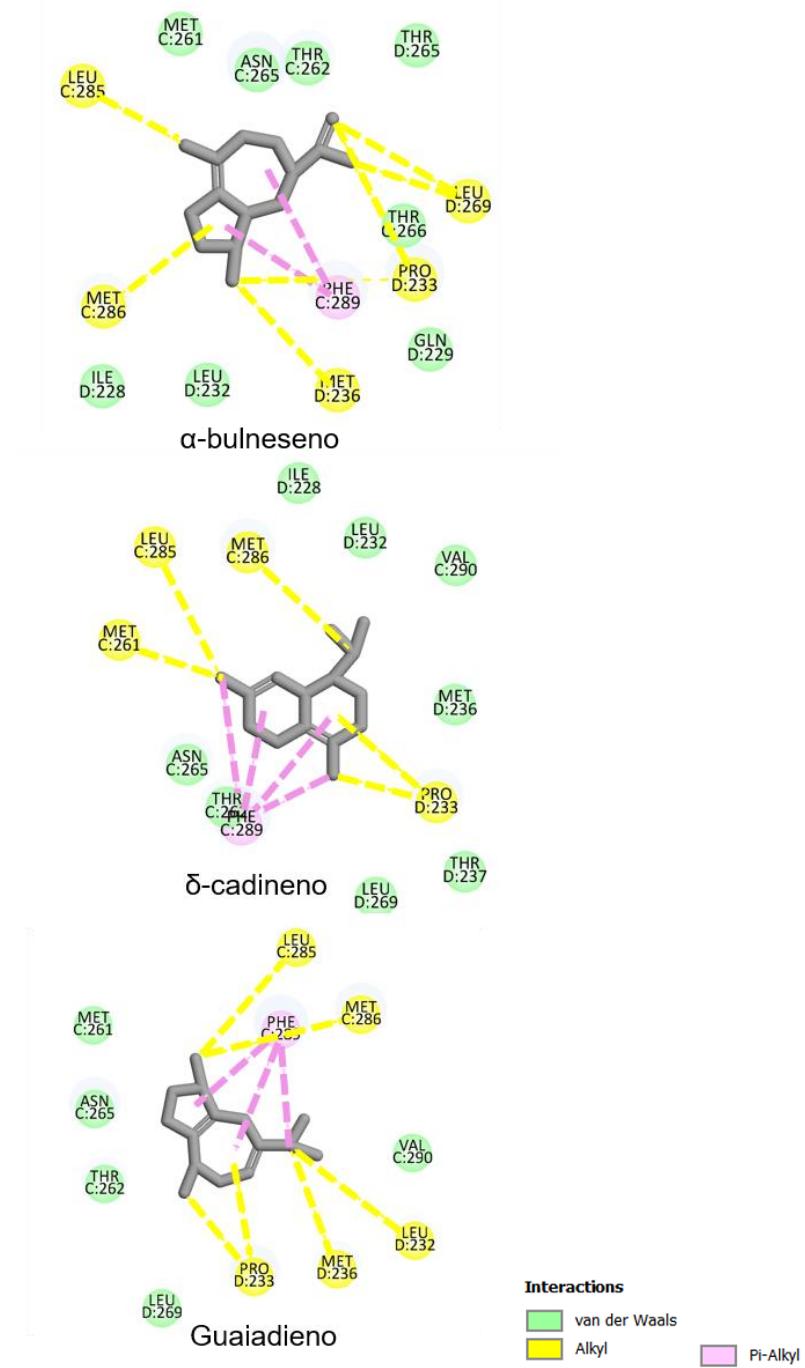


Figura A1. Representações bidimensionais das interações moleculares entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio 3 do receptor GABA_A.

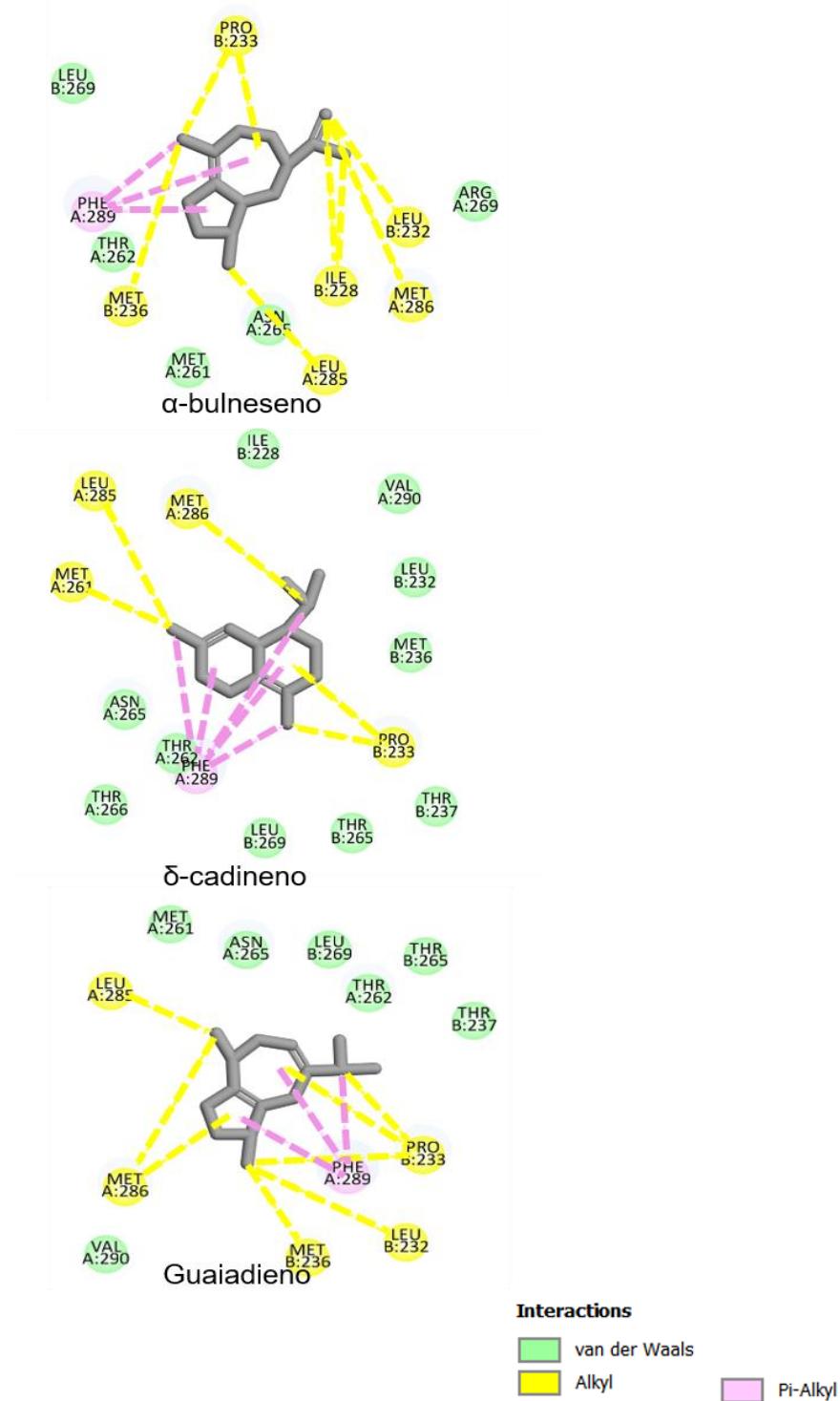


Figura A2. Representações bidimensionais das interações moleculares entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio 3 do receptor GABA_A.

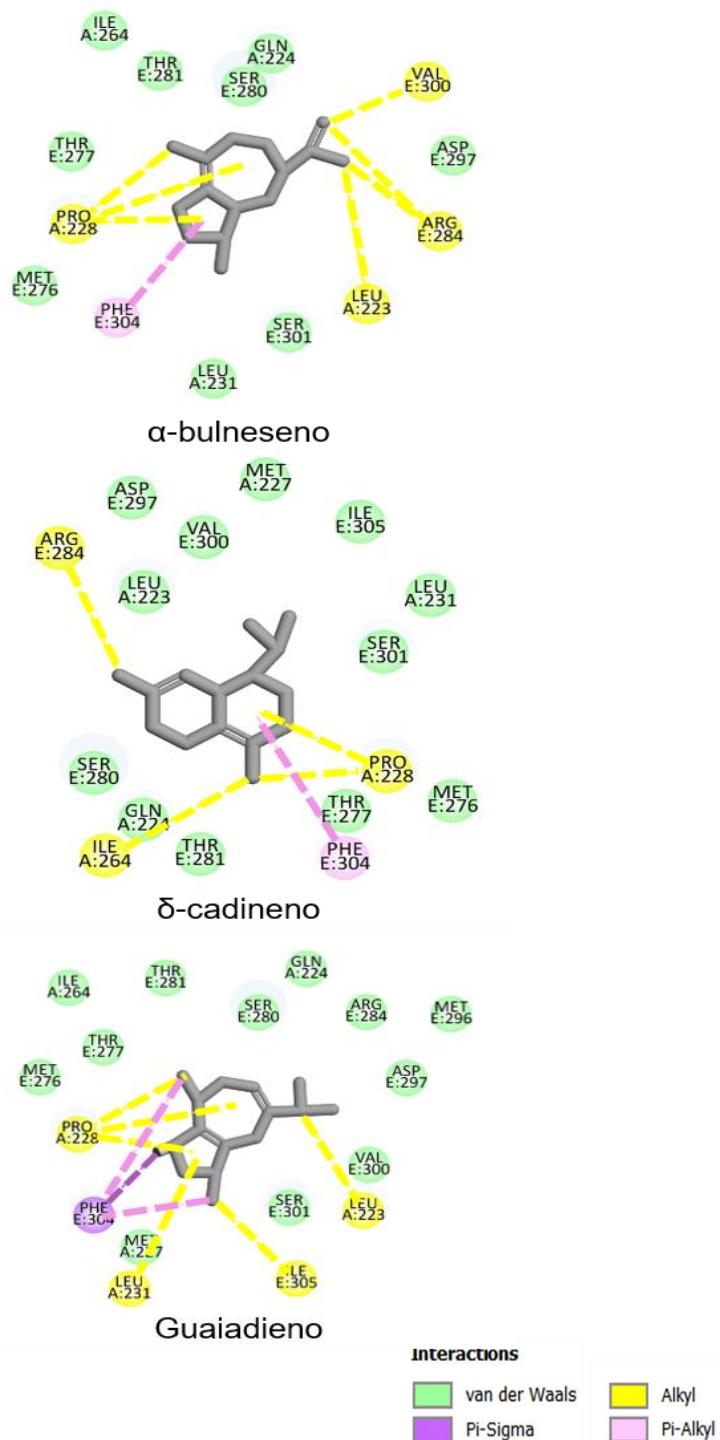


Figura A3. Representações bidimensionais das interações moleculares entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio 4 do receptor GABA_A.

Apêndice B*

RESULTADOS DFT

Lista de Tabelas

Tabela B1: Parâmetros químico-quânticos para os fitoconstituintes do OCH obtidos por DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) em água com modelo implícito SMD.

Tabela B1: Parâmetros químico-quânticos para os fitoconstituintes do OCH obtidos por DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) em água com modelo implícito SMD.

Compostos	Descritores de reatividade química global (eV)						
	(I)	(A)	(μ)	(η)	(χ)	(ω)	GAP(eV)
Monoterpenos hidrocarbonetos							
α-tujeno	5,946	-0,024	-2,961	2,985	2,961	1,469	5,97
α -pineno	6,002	-0,013	-2,995	3,008	2,995	1,491	6,02
sabineno	6,216	-0,013	-3,102	3,115	3,102	1,544	6,23
β- pineno	6,396	-0,019	-3,189	3,208	3,189	1,585	6,42
mirceno	6,261	0,952	-3,607	2,655	3,607	2,450	5,31
α-felandreno	5,696	0,696	-3,196	2,500	3,196	2,043	5,00
(+) - careno-3	6,194	0,060	-3,127	3,067	3,127	1,594	6,13
α-terpineno	5,411	0,562	-2,987	2,425	2,987	1,839	4,85
ρ-cimeno	6,353	0,295	-3,324	3,029	3,324	1,824	6,06
limoneno	6,231	0,021	-3,126	3,105	3,126	1,574	6,21
β-felandreno	6,044	0,760	-3,402	2,642	3,402	2,190	5,28
γ terpineno	5,995	0,052	-3,024	2,972	3,024	1,538	5,94
α-terpinoleno	5,979	0,090	-3,035	2,945	3,035	1,564	5,89
Monoterpenos oxigenados							
1,8-cineol	6,586	0,025	-3,306	3,281	3,306	1,665	6,56
linalol	6,280	0,103	-3,192	3,089	3,192	1,649	6,18
isoborneol	7,251	0,048	-3,650	3,602	3,650	1,849	7,30
terpinene-4-ol	6,322	0,108	-3,215	3,107	3,215	1,663	6,21
α-terpineol	6,211	0,061	-3,136	3,075	3,136	1,599	6,15
Sesquiterpenos hidrocarbonetos							
β-bourboneno	6,469	0,159	-3,314	3,155	3,314	1,741	6,31
β- elemeno	6,478	0,038	-3,258	3,220	3,258	1,648	6,44
B-isocomeno	6,631	0,320	-3,476	3,156	3,476	1,914	6,31
Transcariofileno	6,018	0,063	-3,041	2,978	3,041	1,552	5,96
Guaiadieno	5,774	0,087	-2,931	2,844	2,931	1,510	5,69
α-humuleno	5,957	0,007	-2,982	2,975	2,982	1,495	5,95
epi-trans-cariofileno	6,047	0,103	-3,075	2,972	3,075	1,591	5,94
germacreno D	5,552	0,531	-3,042	2,511	3,042	1,842	5,02
biciclogermacreno	5,513	0,031	-2,772	2,741	2,772	1,402	5,48
α-bulneseno	5,814	0,010	-2,912	2,902	2,912	1,461	5,80
δ-cadineno	5,951	0,087	-3,019	2,932	3,019	1,554	5,86
Sesquiterpenos oxigenados							
germacreno-B	5,732	0,046	-2,889	2,843	2,889	1,468	5,69
espatulenol	6,354	0,072	-3,213	3,141	3,213	1,643	6,28
óxido cariofileno	6,447	0,049	-3,248	3,199	3,248	1,649	6,40
iso-espatulenol	5,857	0,071	-2,964	2,893	2,964	1,518	5,79
Fármacos de referência							
diazepam	6,477	1,753	-4,115	2,362	4,115	3,585	4,72
clonazepam	7,226	2,993	-5,110	2,117	5,110	6,167	4,23
cetamina	5,943	0,895	-3,419	2,524	3,419	2,316	5,05